

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

Entstehung, Entwicklung und Migration von
Makrophagen aus dem embryonalen Dottersack *in vivo*

von Ronja Annika Schuchert
aus Offenbach

München 2017

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Anatomie, Histologie und Embryologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von: Priv.-Doz. Dr. Sven Reese

Angefertigt an der Medizinischen Klinik und Poliklinik I des Klinikums der
Universität München in Großhadern

Mentor: Prof. Dr. med. Christian Schulz

**Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, PhD

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Sven Reese

Korreferent: Prof. Dr. Andrea Fischer
Prof. Dr. Herbert Kaltner

Tag der Promotion: 29.07.17

Meiner Nichte Åse Marie

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	2
1.	Immunsystem – angeboren vs. adaptiv	2
2.	Angeborenes Immunsystem – zellulär vs. humoral	3
3.	Makrophagen – Knochenmark vs. Dottersack	5
4.	Dottersackmakrophagen – Entstehung, andere Tiermodelle, Mensch	8
5.	Funktion von Makrophagen	10
6.	Oberflächenmoleküle von Dottersackmakrophagen	13
III.	ZIELSETZUNG	17
IV.	MATERIAL UND METHODEN	18
1.	Versuchstiere	18
1.1.	Mausmodelle	18
1.1.1.	Wildtypstamm C57BL/6J	19
1.1.2.	Fraktalkin-Rezeptor spezifische Mauslinien	19
1.1.2.1.	Cx3cr1 ^{gfp/gfp}	19
1.1.2.2.	Cx3cr1 ^{gfp/+} Myb ^{+/-}	19
1.1.2.3.	Cx3cr1-Cre Rosa26mT/mG	20
1.1.3.	Csflr-Cre	20
1.1.4.	Csflr-MerCreMer	21
1.1.5.	Rosa26-YFP	21
1.2.	Tierhaltung	22
1.3.	Terminierte Verpaarung	24
2.	Intravitalmikroskopie	25
2.1.	Narkose	25
2.2.	Sectio caesarea	27
2.3.	Epifluoreszenzmikroskop	27
2.4.	Durchführung	28
2.5.	Spinning-Disk-Konfokalmikroskopie	28
3.	Genotypisierung	29

4.	Durchflusszytometrie	30
4.1.	Vorbereitung	31
4.2.	Durchflusszytometer	32
5.	Whole Mount Färbung	33
6.	Statistische Auswertung	34
V.	ERGEBNISSE	40
1.	<i>In vivo</i> Epifluoreszenzmikroskopie zur Analyse der frühen Makrophagenentwicklung im <i>Cx3cr1</i>-GFP Modell	40
2.	Proliferation und morphologische Entwicklung von Dottersackmakrophagen im <i>Cx3cr1</i>-GFP Modell	41
3.	Zelluläre Charakterisierung <i>Cx3cr1</i>-GFP positiver Makrophagen	44
4.	Dottersackmakrophagen infiltrieren den Embryo über das Gefäßsystem	45
5.	Morphologie bestimmt das Migrationsverhalten von Dottersackmakrophagen	48
6.	Isolierte Analyse der Entwicklung von Dottersackmakrophagen im <i>Myb</i>-Knockout Modell	49
7.	Entwicklung von erythro-myeloiden Progenitorzellen und frühen Makrophagen im <i>Csf1r</i>-Modell	51
8.	Klonale Expansion von Dottersackmakrophagen im <i>pulse-labeling</i> Model	53
VI.	DISKUSSION	55
VII.	ZUSAMMENFASSUNG	59
VIII.	SUMMARY	60
IX.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	61
X.	TABELLENVERZEICHNIS	63
XI.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	64
XII.	LITERATURVERZEICHNIS	66

XIII. DANKSAGUNG**77**

I. EINLEITUNG

Makrophagen sind ein essentieller Bestandteil des angeborenen Immunsystems. Unter physiologischen Bedingungen steuern sie in erster Linie die Gewebehomöostase und regulieren somit entscheidende Umbauvorgänge sowohl in der embryonalen Entwicklung als auch im adulten Organismus [1-5]. Unter pathologischen Bedingungen sind sie die Hauptvertreter der phagozytierenden Zellen, das heißt sie nehmen Krankheitserreger und Abfallprodukte ins Zellinnere auf und bauen diese ab. Somit schützen Makrophagen nicht nur vor Infektionen, sondern spielen auch in zahlreichen anderen Krankheitsprozessen eine entscheidende Rolle. In erster Linie sind hierbei zahlreiche chronische Entzündungsprozesse wie atherosklerotische Veränderungen, rheumatische oder neurodegenerative Erkrankungen, Krebs und metabolische Störungen von besonderer Bedeutung und hohem sozioökonomischem Interesse [6-8].

Viele Jahre hat man angenommen, dass sich Makrophagen ausschließlich aus Monozyten des Knochenmarks entwickeln. Mehrere unabhängige Arbeitsgruppen konnten jedoch seit Anfang der 2000er Jahre nachweisen, dass es ergänzend zu Makrophagen aus dem Knochenmark einen weiteren Ursprung von Makrophagen im embryonalen Dottersack gibt [9]. Hier entwickeln sich ab etwa Tag 8.5 der murinen Entwicklung (E8.5) Makrophagenvorläufer, die in verschiedenste Zielorgane auswandern und dort ein Leben lang erhalten bleiben [10-13]. Diese Entwicklung von sogenannten Dottersackmakrophagen ist vollkommen unabhängig vom Knochenmark, sodass klassische Gewebsmakrophagen letztlich eine duale Herkunft aufweisen – den embryonalen Dottersack und das Knochenmark bzw. die sogenannte definitive Hämatopoese [11]. Insbesondere die Entstehung von Makrophagen im murinen embryonalen Dottersack ist noch weitgehend uncharakterisiert und soll im Rahmen dieser Dissertation erstmals intravital untersucht werden. Hierbei sollen insbesondere Fragen in Hinblick auf die Entstehung, die Morphologie und das Proliferationsverhalten sowie die Auswanderung in embryonale Zielorgane adressiert werden.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. **Immunsystem – angeboren vs. adaptiv**

Das Immunsystem umfasst biologische Abwehrmechanismen in Lebewesen gegen eingedrungene Fremdpartikel oder Krankheitserreger. Der Wissenschaftler Ilja Metschnikow beschrieb erstmals die Theorie der zellulären Immunabwehr und erhielt dafür zusammen mit Paul Ehrlich, der damals das humorale System beschrieb, den Nobelpreis [14]. Als Studienobjekt diente ihm eine Seesternart, die seit mehr als 600 Millionen Jahre existiert und die bis heute weitestgehend ihre ursprüngliche Form beibehalten hat. In ihr beobachtete er die Aufnahme von Fremdpartikeln durch Phagozyten und beschrieb erstmals die wesentliche Funktion der Phagozytose, die über die Nahrungsaufnahme hinausgeht: Die intrazelluläre Aufnahme von Fremdpartikel zum Schutz des Organismus [15]. Dazu sind bereits die einfachsten Lebensformen wie Protozoen und Urtierchen in der Lage. Bei Einzellern funktionieren grundlegende Lebensfunktionen wie Gasaustausch, Verdauung als auch die Selbstverteidigung über Phagozytose [16, 17]. Letzter Abwehrmechanismus läuft ähnlich wie bei Phagozyten des Menschen ab [18]. Diese grundlegende Form der angeborenen Immunantwort zählt demnach zu den ältesten und primitivsten Abwehrmechanismen die in allen Tierarten bis hin zu höheren Invertebraten und Vertebraten konserviert ist [16]. Schwämme gelten als die ältesten und einfachsten Vielzeller. Auch in diesen Lebewesen patrouillieren phagozytierende Zellen wie beim Seestern im Coelom oder, wenn sie über keine echte Leibeshöhle verfügen, im Gewebe wie es bei Schwämmen der Fall ist [19]. Abwehrsysteme in allen Organismen setzen die Unterscheidung zwischen selbst und fremd voraus [18]. Schwämme stoßen fremde Transplantate der gleichen Art ab [20]. Anders als bei Wirbeltieren läuft bei ihnen die Abwehr körperfremden Gewebes immer gleich und unspezifisch ab [21].

Bei Wirbeltieren hingegen wird ein zweites Transplantat oder der gleiche eindringende Erreger vom Organismus schneller bekämpft. Das Immunsystem der Wirbeltiere hat sich also weiterentwickelt und zeichnet sich durch eine erworbene, adaptive Immunantwort sowie ein immunologisches Gedächtnis aus, das Wirbellosen fehlt [18, 21-23]. Während die angeborene Abwehr Fremdbestandteile und Krankheitserreger über festgelegte unspezifische Erkennungsmechanismen identifiziert und bekämpft, ist die erworbene Immunabwehr spezialisierter: Typische

Oberflächenmoleküle von Krankheitserregern, sogenannte Antigene, werden durch das Immunsystem erkannt und durch spezifische Antikörper gebunden. In der weiteren Folge werden die Krankheitserreger durch ein Zusammenspiel von angeborenem und erworbenem Immunsystem inaktiviert. Während die Bildung von Antikörpern beim ersten Kontakt mit den Krankheitserregern relativ lange dauert, bestehen bei einem zweiten Kontakt bereits so genannte Gedächtniszellen, die eine schnelle Produktion von spezifischen Antikörpern erlauben. Dieses Prinzip macht man sich in der Medizin zu Nutze, indem man tote oder abgeschwächte Krankheitserreger im Rahmen von Impfungen appliziert, sodass bereits entsprechende Gedächtniszellen gebildet werden können, ohne dass es zu einem Ausbruch der entsprechenden Krankheit gekommen sein muss [23, 24].

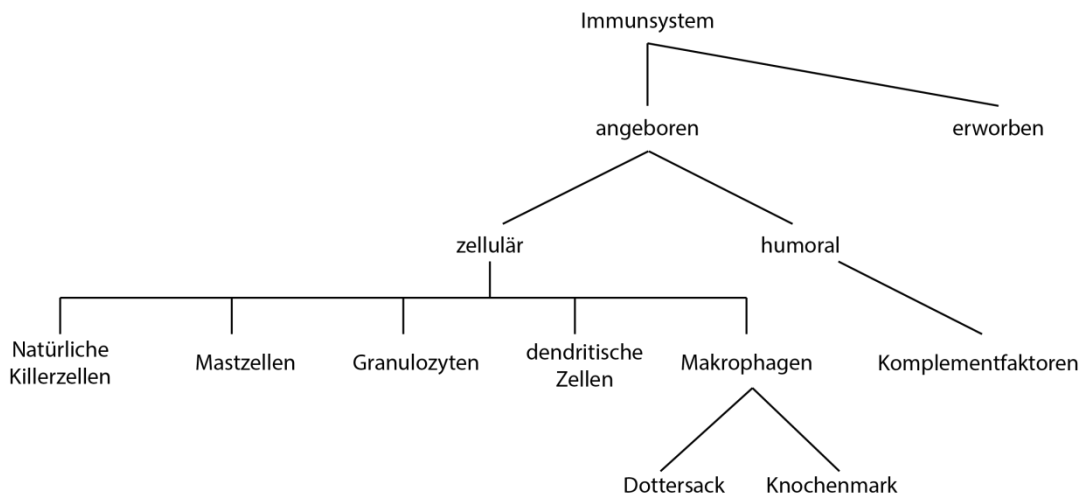


Abbildung 1 Schematische Darstellung der Komponenten des angeborenen Immunsystems

2. Angeborenes Immunsystem – zellulär vs. humoral

Wie im vorigen Kapitel beschrieben, spielen Phagozyten die Hauptrolle in der angeborenen zellulären Immunität. Ein Individuum ist täglich unzähligen Mikroorganismen und Krankheitserregern ausgesetzt, die aber nur selten Erkrankungen auslösen. Die meisten werden durch das angeborene Immunsystem bereits innerhalb von Minuten bis zu wenigen Stunden eliminiert. Externe und interne epitheliale Oberflächen wie die Haut, Magen- und Darmschleimhaut, das Epithel der Lunge sowie des Urogenitaltrakts, stellen die erste physikalische Schutzbarriere des Körpers vor Mikroorganismen oder Pathogenen dar. Wird diese erste Barriere überwunden, ist es die Aufgabe der darunterliegenden oder der im Blut zirkulie-

renden phagozytierenden Immunzellen, den Krankheitserreger zu eliminieren oder zumindest zu schwächen [23]. Zu den Zellen der angeborenen Immunantwort zählen Makrophagen, Mastzellen, Dendritische Zellen (DC), natürlichen Killerzellen (NK) sowie Granulozyten. Diese Instanz der Immunabwehr erkennt Antigene unspezifisch und reagiert auf Pathogene durch Phagozytose oder die Sekretion von Lysozym, sekretorischer Phospholipase A₂ und antimikrobieller Peptide wie Defensin, Cathelicidin und Histatin, die Zellwände von Bakterien spalten können und somit zum Tod der Bakterien führen [23, 25]. Die Phagozytose erfolgt jedoch nicht willkürlich, da es gilt körpereigene Zellen zu schützen und Krankheitserreger gezielt zu identifizieren. Hierzu besitzen Phagozyten unter anderem Komplementrezeptoren für den Faktor C3b der humoralen Immunantwort, F_c-Rezeptoren (Cluster of Differentiation 89, CD89) für ihre Aktivierung und sogenannte Mustererkennungsrezeptoren (pattern recognition receptors, PRR) [26-28]. Diese Rezeptoren erkennen sich wiederholende, pathogen-assoziierte molekulare Strukturen auf der Oberfläche von Pathogenen (pathogen-associated molecular patterns, PAMPS) wie zum Beispiel das LPS von Bakterien oder Mannan-Oligosaccharide in der Zellwand von Hefen [29, 30]. Durch receptorvermittelte Phagozytose, die z.B. durch Makrophagen oder Granulozyten durchgeführt wird, werden Pathogene in die Zellen aufgenommen und zerstört. Bestandteile der aufgenommenen Pathogene werden den Zellen der spezifischen Immunabwehr durch Opsonierung präsentiert.

Der Komplementfaktor C3b dient ebenfalls der Opsonierung körperfremder Zellen und initiiert die Phagozytose durch Makrophagen. Er ist Bestandteil der vielschichtigen Kaskade des Komplementsystems. Das Komplementsystem umfasst etwa 30 lösliche Plasmaproteine, die hauptsächlich in der Leber produziert werden und im Blut als inaktive Pro-Enzyme, auch Zymogene genannt, zirkulieren. Zu den Hauptaufgaben des Komplementsystems zählt die Opsonierung, d.h. die Bedeckung der Oberfläche von Erregern mit Proteinen, um sie für Leukozyten erkennbar zu machen. Einige Bestandteile des Komplements wirken als Chemokine, um die Rekrutierung weiterer Leukozyten herbeizurufen, bis hin zur Auslösung einer Entzündungsreaktion um Infektionen effektiver bekämpfen zu können. [31, 32].

Es existieren drei verschiedene Wege das Komplementsystem zu aktivieren: der klassische Weg, der alternative Weg und der Lektin-Weg. [23] Ziel aller drei Aktivierungswege ist es Pathogene zu bekämpfen, entweder durch direkte Unschäd-

lichmachung, Vorbereitung zur Phagozytose, oder eine inflammatorische Reaktion hervorzurufen, um die Infektion zu bekämpfen.

Der klassische Weg wird durch Antigen-Antikörper-Komplexe, die nach Kontakt mit dem Krankheitserreger gebildet werden, aktiviert. Bindet mannanbindendes Lektin aus dem Blut an die Oberfläche von Pathogenen wie Viren oder Bakterien, setzt diese Reaktion die Kaskade des Lektinwegs in Gang. Über Komplementfaktoren, die spontan an den Erreger binden wird der alternative Weg ausgelöst. Alle drei Möglichkeiten der Komplementaktivierung führen durch proteolytische Aktivierung weiterer Komplementfaktoren über unterschiedliche Wege zu den Konvertasen C3 und C5, den Ausgangspunkten des folgenden gemeinsamen Reaktionsweges. Dieser führt letztendlich zur Bildung eines Membranangriffskomplexes der, wie der Name vermuten lässt, zur Schädigung der Zellmembran und somit zur Lyse der Zelle führt [23, 32].

3. Makrophagen – Knochenmark vs. Dottersack

Makrophagen gehören dem mononukleären Phagozytensystem (MPS) der angeborenen Immunantwort an. Das Konzept des MPS wurde 1968 von van Furth aufgestellt [33]. Demzufolge wurden Makrophagen und Monozyten als verwandte Zelltypen, differenziert aus einer myeloiden Vorläuferzelllinie angesehen. Gegenätzlich des über lange Zeit akzeptierten Paradigmas, dass alle Makrophagen aus zirkulierenden Monozyten des Knochenmarks nach Einwanderung ins Gewebe differenzieren, belegen Studien Anfang 2000 eine weitere, zusätzliche Quelle für gewebständige Makrophagen – den embryonalen Dottersack [10, 11, 34, 35]

Der Dottersack differenziert sich aus dem lateralen Mesoderm der dreischichtigen Keimblase. Infolge der Coelombildung spaltet sich das laterale Mesoderm in ein parietales und viszerale Blatt. Die Dottersackwand wird demnach aus dem viszeralen Blatt des Mesoderms und dem Entoderm der Keimblase zusammengesetzt. Je nach Tierart bleibt der Dottersack über eine kurze oder lange Zeitspanne der Embryonalentwicklung bestehen und übernimmt vorübergehende Blutbildungsfunktion oder zusätzlich, wie zum Beispiel beim Pferd, auch die Ernährungsfunktion des Embryos [36].

Weitere Untersuchungen bestärkten die Annahme, dass gewebständige Makrophagen dualer Abstammung sind [37, 38]. Die Verfolgung der genetischen Ab-

stammung gewebständiger Makrophagen konnte schließlich bestätigen, dass Makrophagenvorläuferzellen bereits in der Embryonalentwicklung vom Dottersack in die Organe und Gewebe des Embryos einwandern [11, 35, 39]. Langerhans Zellen in der Epidermis von Mäusen konnten ihre Population selbst aufrechterhalten. Sie wurden zunächst einer letalen Bestrahlungsdosis ausgesetzt und erhielten anschließend eine kongene Knochenmarkstransplantation. Das heißt die Knochenmarkszellen stammten von Tieren, die sich in einem bestimmten Genabschnitt oder nur einem Genlokus von den Zellen der Empfängertiere unterscheiden und dadurch in weiteren Versuchen von diesen differenziert werden konnten. Monozyten der Spendertiere trugen nicht zur Repopulation der Langerhans Zellen bei den Empfängertieren bei [40, 41]. Langerhans Zellen waren auch Ziel einer Untersuchung am Menschen nach erfolgreicher Handtransplantation. Es konnte gezeigt werden, dass in der Haut befindliche Langerhans Zellen selbst nach 10 Jahren post-Transplantation nicht vollständig durch zirkulierende Monozyten des Empfängers ersetzt wurden. Selbst nach mehreren Jahren wurden in Hautbiopsien noch Langerhans Zellen des Spenders nachgewiesen [13].

Einen weiteren ausschlaggebenden Hinweis auf den Dottersack als zweite Quelle von Makrophagen zeigten murine Embryonen, die keine Blutzirkulation aufwiesen. Aufgrund eines Defektes im Natrium-Kalzium-Austauscher 1 ist das Herz nicht in der Lage zu arbeiten, was in einem ausbleibenden Herzschlag und folglich in einer fehlenden Blutzirkulation im Embryo resultiert [42]. In diesem Modell waren Makrophagen nicht in der Lage, den Embryo zu besiedeln und verblieben im Dottersack [43, 44].

Versuche in parabiotischen Mäusen, deren Blutzirkulation miteinander verbunden war, lieferten vergleichbare Ergebnisse: Obwohl Vorläuferzellen im Blut beider Tiere zu finden waren, trugen zirkulierende Monozyten nicht oder nur zu einem geringen Maße zu Populationen gewebständiger Makrophagen in Lunge, Haut und Gehirn bei [41, 45, 46]. Je nach Organ wird für Makrophagen ein unterschiedliches Verhältnis zwischen Dottersack- oder Knochenmarksmakrophagen beschrieben. Die Anzahl von Dottersackmakrophagen in der Lamina propria des Dünndarms und Kolons nimmt bis zum Absetzen der Jungtiere progressiv ab, um innerhalb der ersten Wochen nach der Geburt vollständig durch einwandernde Monozyten des Knochenmarks ersetzt zu werden [47, 48]. Das spezifische Umfeld des Darms und die drastische Veränderung des mikrobiellen Milieus zu diesem Zeitpunkt sind wahrscheinlich der Auslöser dieses Austausches der beiden

Makrophagenpopulationen [47]. Mikroglia hingegen, die gewebsständigen Makrophagen im Gehirn, sind ausschließlich extraembryonalen Ursprungs [43, 49, 50]. Die Blut-Hirn-Schranke verhindert den permanenten Influx von Monozyten, insbesondere auch den von inflammatorischen Monozyten, die nur passager im Rahmen einer akuten Entzündung ins Hirngewebe rekrutiert werden können. In adulten Mäusen persistieren Makrophagen aus dem embryonalen Dottersack in verschiedensten Geweben, das bedeutet sie können sich durch lokale Proliferation autonom erhalten und sind somit unabhängig von der definitiven Hämatopoese [11, 40, 51].

Auch Untersuchungen an der schwarzbäuchigen Taufliege *Drosophila melanogaster* zeigen zwei nebeneinander bestehende myeloide Zelllinien, die denen von Vertebraten ähneln. In der Taufliege sind 90% der Hämocyten sogenannte Plasmatozyten, die vergleichbar mit den Makrophagen in Vertebraten sind. Auch hier ist ein dualer Ursprung von Makrophagen konserviert. Sie entstehen zum einem aus dem embryonalen Kopfmesoderm, wandern in die Larve und bilden hier die Population der selbsterhaltenden, gewebsständigen Makrophagen. Im weiteren Entwicklungsverlauf entsteht die zweite Population in dem Lymphknoten des Embryos [52, 53].

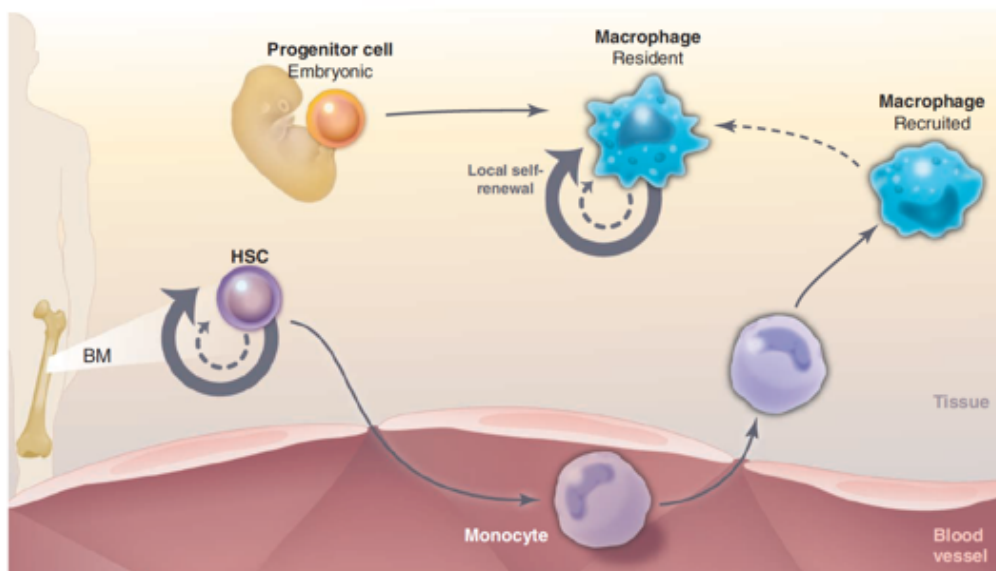


Abbildung 2 Dualer Ursprung gewebsständiger Makrophagen aus dem Dottersack und der definitiven Hämatopoese

From “Beyond Stem Cells: Self-Renewal of Differentiated Macrophages”, Sieweke and Allen, 2013 [54]. Reprinted with permission from (AAAS).

4. Dottersackmakrophagen – Entstehung, andere Tiermodelle, Mensch

Der teilweise embryonale Ursprung gewebsständiger Makrophagen gilt heute als etabliertes Konzept. Ebenso gibt es nach heutigem Wissensstand einen dualen Ursprung der Makrophagen – zum einem aus dem Dottersack und zum anderen aus der definitiven Hämatopoese, das bedeutet in erster Linie dem Knochenmark. Unklar bleiben jedoch die genaue Entwicklung und die Differenzierung der Vorläuferzellen aus dem Dottersack zu Makrophagen. Die Dottersackhämatopoese beginnt im murinen Embryo ab Tag 7.5 der Embryonalentwicklung (E7.5), wobei erste definitive hämatopoetische Stammzellen (HSCs) erst etwas später ab Tag E10.5 in der dorsalen Aorta der Aorta-Gonaden-Mesonephros-Region (AGM-Region) zu finden sind [10, 55-58].

Blutinseln im Dottersack stellen die ersten Orte der Blutbildung dar und bestehen unter anderem aus Hämangioblasten. Durch die Differenzierung der außenliegenden Zellen der Zellaggregate zu Endothelzellen kommt es zur Bildung von Dottersackgefäßen. Zunächst differenzieren sich im Dottersack zwei voneinander getrennte, in der zeitlichen Entstehung teilweise überschneidende Populationen an erythroiden Vorläufern: primitive erythroide Vorläuferzellen und darauffolgende definitive erythroide Vorläufer. Diese beiden Populationen sind generell bei Säugetieren vorzufinden und können insbesondere morphologisch und zellbiologisch, durch unterschiedliche Globingene unterschieden werden [59-61].

In Analogie zur zweistufigen Entwicklung von Erythrozyten entwickeln sich wenig später auch Makrophagen in zwei kurz aufeinander folgenden Wellen. Zunächst lassen sich unreife, primitive Makrophagen in den Blutinseln des Dottersacks von Maus und Ratte um Tag E8.5 bzw. E9.0 nachweisen [10, 11, 62]. Allen Beobachtungen zufolge, handelt es sich bei diesen Zellen um unipotente Vorläuferzellen [56]. Kurz nach der Erscheinung der primitiven Makrophagen in den Blutinseln des Dottersacks, verteilt sich eine weitere multipotente Population von Vorläuferzellen mit erythroidem als auch myeloidem Potential (erythro-myeloide Progenitorzellen, EMPs) von Tag E8.5 bis E11.5 im Dottersack. Sie vermehren sich in ihrer Anzahl bis Tag E9.5 und sind ab Tag E10.5 auch in der AGM-Region vorzufinden. Aus dieser Zellpopulation können sich *in vitro* Makrophagen, Granulozyten und Mastzellen differenzieren [63]. Die signifikante Expression von Kit und CD41 auf ihrer Oberfläche ist charakteristisch für EMPs und lässt sie von

primitiven Makrophagen und der ersten primitiven erythroiden Zellpopulation zu diesem Zeitpunkt abgrenzen. EMPs sind bis Tag E12.5 im embryonalen Blutkreislauf vorzufinden und besiedeln zu diesem Zeitpunkt die fetale Leber, wo sie weiter differenzieren [64]. EMPs wurden ebenfalls im Zebrafisch analysiert und grenzen sich auch hier von HSCs und der primitiven Hämatopoese ab [55, 65].

Im humanen Embryo beginnt die Hämatopoese in den Blutinseln des Dottersacks um den 18-19. Schwangerschaftstag und dauert drei bis sechs Wochen an. Die dort gebildeten primitiven Stammzellen haben ausschließlich erythro-myeloides Potenzial. In der fünften bis siebten Schwangerschaftswoche beginnt beim Menschen die definitive Hämatopoese ebenfalls in der Aorta-Gonaden-Mesonephros Region des Embryos. Im weiteren Verlauf übernimmt die fetale Leber temporär zwischen der vierten und siebten bis zur 22. Schwangerschaftswoche die fetale Hämatopoese, bis die endgültigen sich entwickelnden hämatopoetischen Organe, das Knochenmark und die Milz, schließlich die Blutbildung übernehmen. Das Knochenmark wird etwa um die 10,5te Schwangerschaftswoche aktiv. Hämatopoetische Zelllinien werden kontinuierlich aus dem Knochenmark ersetzt [66]. Auch im Menschen deuten verschiedene Untersuchungen darauf hin, dass gewebständige Makrophagen unabhängig von der definitiven Hämatopoese während der embryonalen Entwicklung im Dottersack entstehen. Lange vor dem ersten Erscheinen von Makrophagen im humanen Thymus oder Knochenmark, konnten proliferierende Makrophagen bereits intravasal als auch extravasal in mesenchymalen Geweben nachgewiesen werden [66-68].

Der Transkriptionsfaktor *c-Myb* ist für die definitive Hämatopoese essentiell. Dieser wird in allen Zellen definitiver hämatopoetischer Zelllinien exprimiert und wird nach Differenzierung der Zellen herunterreguliert. *C-Myb* gehört als Proto-Onkogen zu der Myeloblastosis (*Myb*) Familie. Diese Familie von Transkriptionsfaktoren ist an der Regulierung von Zelldifferenzierung und -proliferation beteiligt und umfasst die drei Mitglieder: A-, B- und *c-Myb* [69-71]. Der Name leitet sich von dem zuerst beschriebenen *v-Myb* Gen des „avian myeloblastosis virus“ (AMV) ab. Dieses virale *v-Myb* Gen ist dem tierischen zellulären *c-Myb* Gen sehr ähnlich. Das Retrovirus verursacht bei Tieren eine myeloblastische Leukämie [72, 73].

Durch die Generierung von *Myb*-Knockout Mäusen, wurden die Funktionen des Transkriptionsfaktors untersucht. *Myb*^{-/-} Mutanten entwickeln sich bis Tag 13 der

Trächtigkeit normal, weisen aber nach 15 Tagen einen blassen, anämischen Phänotyp auf. Da die definitive Hämatopoese in der fetalen Leber und später die des Knochenmarks ausbleibt, sterben die Tiere an einer schweren Anämie. Die Blutbildung im Dottersack dagegen bleibt unverändert, sodass aus dem Dottersack entstehende myeloide Zellen in *c-Myb*^{-/-} Mutanten vorhanden sind [11, 43, 74, 75].

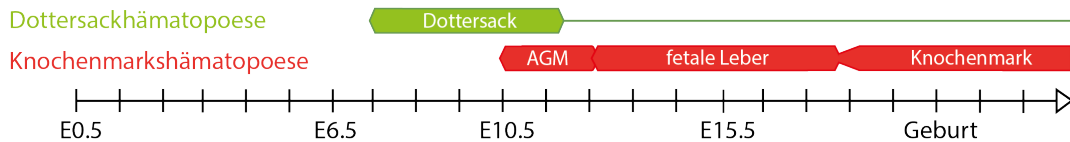


Abbildung 3 Zeitliche Entstehung der Knochenmarks- und Dottersackhämatopoese in der Maus

5. Funktion von Makrophagen

Gewebsständige Makrophagen sind in allen Organen und serösen Membranen des Körpers zu finden. Mit ihren Zellausläufern und Dendriten bilden sie in den jeweiligen Organen ein umfangreiches Netzwerk, das ihnen ermöglicht, schnell auf Pathogene oder abgestorbene Zellen zu reagieren [76]. Eine Aktivierung der Makrophagen bewirkt eine Änderung ihrer Zellmorphologie, die mit der Migration zum Ort der Entzündung oder der Phagozytose von eingedrungenen Pathogenen einhergehen kann. Auch wenn gewebsständige Makrophagen in den verschiedenen Organen ähnliche Eigenschaften besitzen, sind sie äußerst spezifisch an das jeweilige Milieu angepasst und übernehmen abhängig von ihrer Lokalisation spezifische Funktionen. Neben ihren allgemeinen Aufgaben eindringende Pathogene zu phagozytieren, die Ausschüttung von Zytokinen und Chemokinen, sowie die Präsentation von Antigenen auf ihrer Oberfläche, spielen Makrophagen eine wichtige Rolle bei der Gewebemöostase. Sie phagozytieren sowohl nekrotische als auch apoptotische Zellen, Zellkerne die von reifenden Erythrozyten freigesetzt werden oder Zelldebris. In juvenilen Tieren und Feten spielen Makrophagen eine essentielle Rolle im Hinblick auf die Morphogenese diverser Gewebe und Organe [77]. Dass Dottersackmakrophagen ebenfalls in der Angio- und Vaskulogenese beteiligt sind, zeigen Untersuchungen am murinen Rhombencephalon und der Retina [78-

80]. Die Bildung neuer funktionaler Blutgefäße erfordert das Sprießen neuer Gefäße, induziert durch den Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) [81]. Dieser wird unter anderem von Makrophagen produziert [82, 83]. VEGF stimuliert endotheliale „Tip“ Zellen an der Spitze von Kapillaren, die Filopodien ausbilden und chemotaktisch VEGF Gradienten erkennen, um mit anderen Gefäßen Anastomosen zu bilden. Im sich entwickelnden murinen Rautenhirn beispielsweise, sind Dottersackmakrophagen vor Beginn der definitiven Hämatopoese anzutreffen. Sie exprimieren zwei für die Angiogenese essenzielle Oberflächenproteine: den Angiopoetinrezeptor TIE2, sowie den NRP1 Rezeptor, an den unter anderem auch Isoformen des VEGF binden [84, 85]. Weiterhin ist ihre Lokalisation vor allem gefäßassoziiert und mit der Entwicklung des subventrikulären Plexus steigt ihre Anzahl. Im Gegensatz dazu ist in PU.1-defizienten Embryonen das vaskuläre Netzwerk im subventrikulären Plexus weniger komplex [78]. PU.1 ist ein für myeloide und lymphoide Zelllinien essenzieller Transkriptionsfaktor und für die normale Entwicklung von Makrophagen als auch für die Differenzierung von B-Zellen notwendig [86].

Neben Wachstumsfaktoren sezernieren Makrophagen auch Matrix-Metalloproteasen. Diese haben wiederum verschiedene Funktionen. Neben der Regulation von Fibrin und Kollagen, die für die Gewebshomöostase von ausschlaggebender Bedeutung sind, besitzen sie proinflammatorische Wirkung indem sie die Basalmembran zerstören, um das Einwandern von Entzündungszellen zum Ort der Entzündung zu erleichtern [83, 87-89].

Die Ablation des Zytokins M-CSf1, des *macrophage colony stimulating factor-1*, das für die Reifung von Makrophagen verantwortlich ist, führt im entwickelnden Embryo zu schweren Formen von Osteoporose durch fehlende Osteoklasten, sowie weiteren Entwicklungsanomalien in Nieren, Milchdrüsen, Gehirn und Pankreas. Dies gibt einen Hinweis auf die vielfältigen Aufgaben von gewebständigen Makrophagen [90-92].

Besonders gut untersucht sind Mikroglia und ihre Interaktion mit Neuronen während der Entwicklung des Gehirns. Makrophagen sind verantwortlich für die synaptische Beschneidung der Neuronen [77, 93]. Diese ist von enormer Bedeutung, da im sich entwickelnden Gehirn mehr Neuronen gebildet werden als gebraucht werden. Der Abbau dieser überflüssigen Synapsen steigert die Funktion des neuronalen Netzwerks [94]. Die Ablation von Mikroglia in diesem Zeitraum führt neben einer gestörten Beschneidung der Synapsen und der damit einhergehenden

gestörten Entwicklung des Gehirns auch zu Defiziten in der Entwicklung des olfaktorischen Systems. Außerdem setzen Mikroglia neurotrophe Zytokine wie Neurotrophin oder IGF-1 frei [95]. Mikroglia sind auch an der Pathogenese neurodegenerativer Erkrankungen wie Alzheimer beteiligt, indem sie nach Aktivierung neurotoxische Substanzen wie Zytokine oder Proteasen freisetzen [96, 97].

Auch in adulten Organismen haben Makrophagen entscheidende Aufgaben. Alveolarmakrophagen nehmen das von Epithelzellen gebildete Surfactant auf und übernehmen hier die Reinigungsfunktion durch Aufnahme von Partikeln in den Alveolen [98, 99]. Ähnlich verhalten sie sich in Knochenmark, Leber und Milz. Hier phagozytieren Makrophagen absterbende Erythrozyten in der Milz oder entfernen im Knochenmark apoptotische, zirkulierende neutrophile Granulozyten und tragen somit zu einem großen Teil der Homöostase in diesen Organen bei. Als Kupffer Zellen des Lebergewebes sind sie intravaskulär in den Lebersinusoiden lokalisiert, um ihren Beitrag an der Filtration des Blutes zu liefern [100, 101]. Auch im Fettgewebe sind Makrophagen vorzufinden. Durch Kälteexposition des Organismus werden zelluläre thermogenetische Programme in den Adipozyten initiiert. Auslöser dafür ist die Ausschüttung von Noradrenalin durch lokale Makrophagen, die somit im weißen Fettgewebe Lipolyse und im braunen Fettgewebe eine thermogenetische Genexpression aktivieren [102, 103].

Wie schon erwähnt ist Phagozytose eine der Hauptfunktionen und verleiht den Makrophagen ihren Namen. Oberflächenrezeptoren, die Phagozytose initiieren gehören unter anderem zur Gruppe der C-Typ Lektin Rezeptoren, den Scavenger Rezeptoren sowie den Toll-like Rezeptoren. Hinzu kommen Chemokinrezeptoren der Gruppe der G-Protein gekoppelten Rezeptoren [104-106].

Bindet ein Makrophage mit seinen PRRs an entsprechende mikrobielle Oberflächenmoleküle, erfolgt eine Veränderung des Aktinzytoskeletts und die Internalisierung dieses Partikels. Das gebundene Pathogen wird von der Plasmamembran des Makrophagen umschlossen und anschließend mittels eines endozytären Vesikels, dem Phagosom, internalisiert. Der saure pH-Wert des Phagosoms tötet oder schwächt bereits die meisten Pathogene ab. Das Phagosom fusioniert im weiteren Verlauf mit einem oder mehreren Lysosomen zum Phagolysosom. Bei diesem Prozess setzen die Lysosomen Proteasen frei, die das Pathogen endgültig eliminieren [29, 104].

Abhängig von der Art der Aktivierung und der resultierenden funktionellen Ei-

genschaften, unterteilt man Makrophagen in M1 und M2 Makrophagen. Durch die Bindung der Lipopolysaccharide in der Zellwand von Bakterien mittels dem auf der Makrophagenoberfläche exprimierten TLR4, sowie der Kontakt zu Interferon- γ (IFN- γ), erfolgt die „klassische“ Aktivierung [107]. Die durch diesen Mechanismus aktivierten M1 Makrophagen produzieren proinflammatorische Zytokine, vor allem Interleukin-1 (IL-1), IL-6 IL-12 und das Zytokin Tumor Nekrose Faktor- α (TNF- α) [104, 108]. Dadurch werden neutrophile Granulozyten und T-Zellen rekrutiert um Infektionen gezielter zu bekämpfen [104].

Zusätzlich zu der klassischen Aktivierung kann es durch Makropathogene, wie beispielsweise Helminthen, oder von T2-Helferzellen freigesetzte Zytokine wie IL-4 und IL-13, zur „alternativen“ Aktivierung kommen [109-111]. Die Aufgabe dieser alternativ aktivierten M2 Makrophagen ist weniger die Eliminierung des Erregers, als die immunmodulatorischen Aufgaben, sowie die Aufrechterhaltung und Reparatur des Gewebes. Dafür sezernieren sie Wachstumsfaktoren wie IGF-1, TGF- β , das bereits erwähnte VEGF- α sowie Wnt Proteine. Durch die große Varianz der auf Makrophagen wirkenden Signale, können Makrophagen zwischen den Stadien wechseln oder Formen mit beiden Funktionen einnehmen [112].

Bei der Definition der Aufgaben von Makrophagen ist nicht beschrieben, welche der zwei Populationen welche Aufgaben übernimmt. In Zukunft gilt es zu klären, ob sich Makrophagen aus dem Dottersack von Makrophagen aus dem Knochenmark auch funktionell unterscheiden.

6. Oberflächenmoleküle von Dottersackmakrophagen

Wie auf allen Leukozyten wird auch auf Makrophagen der Zelloberflächenrezeptor CD45, auch als leukocyte common antigen bezeichnet, exprimiert. Ein weiterer Name ist Rezeptor-Typ Tyrosin-Proteinphosphatase C (PTPRC). Es handelt sich dabei um eine Tyrosinphosphatase auf der Plasmamembran. Als Alloantigen mit unterschiedlichen Isoformen, wird es auf murinen Leukozyten als CD45.1 oder CD45.2 exprimiert. CD45 interagiert mit T-Zell Rezeptoren um diese zu aktivieren [113].

CD11b (cluster of differentiation molecule 11b) ist auch als α M Untereinheit des Proteins Integrin α M/ β 2 bekannt und wird auch Mac-1 α genannt [114]. Zusammen mit CD18 bildet es den Complement Rezeptor 3 (CR3). Es ist an verschiede-

nen Funktionen der Zellen beteiligt, wie Phagozytose, Zellmotilität oder – adhäsion [115]. Exprimiert wird CD11b auf Monozyten, Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und natürlichen Killerzellen [116].

Integrine sind Adhäsionsrezeptoren die sich aus jeweils einer α - und einer β -Untereinheit zusammensetzen, um sogenannte Heterodimere zu bilden. Acht β -Untereinheiten können sich mit 18 α -Untereinheiten zu mindestens 24 unterschiedlichen Heterodimeren kombinieren. Die Integrin- $\beta 2$ Subfamilie umfasst vier Mitglieder, darunter Integrin $\alpha M/\beta 2$. Integrine spielen eine Rolle bei der Zelladhäsion sowie der Leukozyten Rekrutierung. Die Generierung von αM Nullmutationen in Mäusen führt zur Apoptose von PMN (Neutrophile polymorphnukleäre Granulozyten) und beeinträchtigt die Phagozytose von Fresszellen [117, 118].

Das Glykoprotein F4/80 ist ein für Makrophagen der Maus spezifischer Marker. Der monoklonale F4/80 Antikörper ist einer der spezifischsten Oberflächenmarker für murine Makrophagen [119, 120]. F4/80 wird konstitutiv exprimiert und weist in gewebsständigen Makrophagen, die dem Dottersack entstammen, eine hohe Expression auf. Im Gegensatz dazu wird F4/80 in Monozyten und Makrophagen des Knochenmarks geringer exprimiert [11].

Das Chemokin Fraktalkin (Cx3cl1, FKN oder Neuroactin) fungiert als Ligand für den Fraktalkinrezeptor Cx3cr1, der zu den G-gekoppelten Transmembranrezeptoren gehört [121]. Chemokine zählen zu den chemotaktischen Zytokinen. Sie werden strukturell anhand der Abfolge von Cysteinresten an der terminalen Amino-Gruppe unterteilt. Die zwei umfangreichsten Gruppen sind die CC und die CXC Gruppe. In der Gruppe der CC Chemokine liegen die Cysteinreste direkt beieinander, wohingegen sie in der CXC Gruppe durch eine Aminosäure voneinander getrennt sind [104, 122]. CX₃C fällt unter keine der beiden Familien. Zwischen den beiden Cysteinresten liegen drei Aminosäuren. Fraktalkin ist der einzige Vertreter dieser Gruppe [104, 123, 124]. Die vierte Gruppe bilden die C-Chemokine, die nur ein Cysteinrest besitzen [125].

Chemokine aktivieren Leukozyten und fördern ihr Migrationsverhalten. Fraktalkin spielt eine Rolle bei der Zelladhäsion und vermittelt die Einwanderung von myeloiden Zellen bei Entzündungen [126, 127]. In der Embryonalentwicklung wird der Fraktalkinrezeptor in Makrophagen und bereits in ihren Vorläufern exprimiert [10, 128].

Kit, CD117, wird auch Stammzellfaktor-Rezeptor genannt. Es handelt sich um

einen transmembranen Tyrosinkinase-Rezeptor, der durch das Proto-Onkogen c-Kit codiert wird [129]. Er wird vor allem auf hämatopoetischen Stammzellen, sowie myeloischen als auch multipotenten Vorläuferzellen hoch exprimiert. Auf lymphoiden Vorläuferzellen dagegen ist die Expression gering. Durch Bindung seines Liganden SCF (Stem Cell Factor) an die extrazelluläre Domäne wird der Rezeptor aktiviert und trägt zur Differenzierung sowie Proliferation der Zelle bei [130]. Weitere Aufgaben von Kit liegen in der Hämatopoese, Melanogenese sowie Spermatogenese. In der Krebsdiagnostik wird c-Kit als Marker bestimmter Tumorarten herangezogen, da eine Mutation des Rezeptors eine ligandenunabhängige Aktivierung des Rezeptors und somit autonome Proliferation der betroffenen Zellart mit sich bringen kann [131]. Kit wird auf frühen Dottersackmakrophagen, die sich aus EMPs differenzieren, im Dottersack ab Tag E8.5 exprimiert [35, 128].

Der Kolonie stimulierende Faktor 1 (*colony stimulating factor -1*, Csf-1), auch unter dem Namen Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor (*Macrophage colony stimulating factor*, M-Csf) bekannt, kodiert für ein Zytokin. Bindet es an den transmembranen Tyrosinkinase Rezeptor Csf1r, wird dieser durch Oligomerisierung und Transphosphorylierung aktiviert und führt somit zur Aktivierung und Proliferation von Makrophagen. Die Entdeckung, dass in einer osteopetrotischen Mauslinie die Abwesenheit von Csf-1 aufgrund einer Nullmutation des Csf-1 Gens zur Symptomatik der Osteopetrose führt, trug erheblich zur Klärung der Funktion dieses Proteins bei [132]. Neben dem Krankheitsbild der Osteopetrose, für die ein Mangel an Osteoklasten verantwortlich ist, zeigen Mäuse mit dieser Mutation unter anderem einen hochgradigen Mangel an mononukleären Phagozyten [133]. Vorläuferzellen von Dottersackmakrophagen besitzen das c-fms Proto-Onkogen, das für Csf1r kodiert. Csf1r wird von Makrophagen-Vorläuferzellen bereits im Dottersack und Embryo exprimiert, bevor die definitive Hämatopoese in der Leber etabliert ist. In der weiteren Entwicklung können die sich aus Csf1r positiven Vorläuferzellen differenzierenden Prämakrophagen mittels Cx3cr1 und schließlich mit dem für Makrophagen spezifischen Marker F4/80 oder des Complement Rezeptors CR3 identifiziert werden [128, 134].

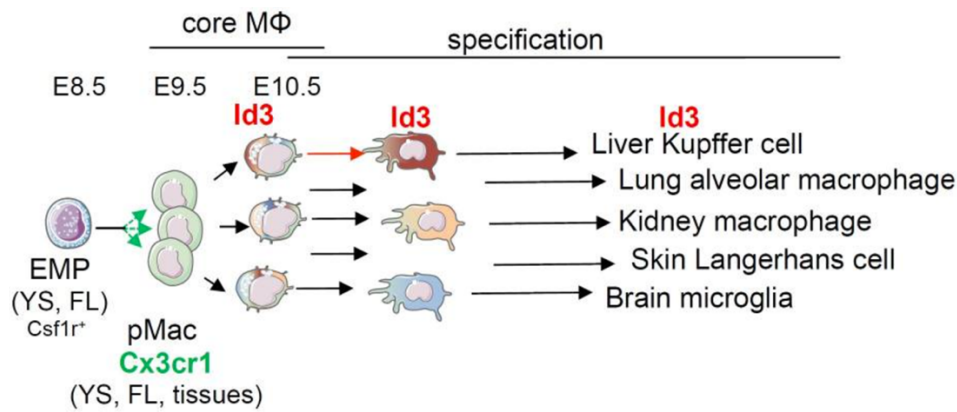


Abbildung 4 Entwicklungsstufen von Dottersackmakrophagen mit entsprechenden Oberflächenmarkern

From "Specification of tissue-resident macrophages during organogenesis", Mass et.al., 2016 [128]. Reprinted with permission from AAAS.

Expressionsprofil von Makrophagen aus dem Dottersack

Eythromyeloide Vorläuferzellen werden durch die Expression folgender Oberflächenmarker charakterisiert: c-Kit, CD41, AA4.1, CD16/32, CD45.

Ab Tag E9.5, vor der Bildung HSCs, sind im murinen Embryo Makrophagen vorzufinden, die ein charakteristisches Expressionsmuster aufweisen. Sie tragen den Leukozytenmarker CD45 (CD45⁺) und zeigen bereits eine hoch ausgeprägte Expression von Cx3cr1 (Cx3cr1^{high}). Daneben exprimieren sie in hohem Maße F4/80 (F4/80^{bright}), wohingegen CD11b gering exprimiert wird (CD11b^{low}). Diese Zellpopulation ist in allen embryonalen Geweben anwesend. Bei der Analyse embryonalen Gewebes ab E12.5, zu einem Zeitpunkt zu dem die Bildung hämatopoetischer Stammzellen bereits stattfindet, ist im Embryo eine zweite Makrophagenpopulation detektierbar. Diese Makrophagen werden mit einem ähnlichen Expressionsprofil beschrieben: Neben der CD45⁺ und geringeren Cx3cr1 Expression ist die Expression von F4/80 und CD11b kontrovers zu der der frühen Makrophagenpopulation. F4/80^{low} und CD11b^{high} Makrophagen erscheinen zwar auch in den meisten Organen des Fetus, nicht aber im Gehirn. Zusätzlich zu ihrem Expressionsprofil können die zwei myeloiden Populationen genetisch aufgrund ihrer Abhängigkeit zu dem Transkriptionsfaktor *Myb* unterschieden werden. Nach Ausschaltung des für die definitive Hämatopoese notwendigen Transkriptionsfaktors in *Myb*-defizienten Embryonen und Feten, fehlt in diesen Tieren die Makrophagenpopulation F4/80^{low} und CD11b^{high}.

III. ZIELSETZUNG

Die Entstehung von Makrophagen im embryonalen Dottersack ist noch wenig charakterisiert. Mittels Epifluoreszenzmikroskopie sollen Dottersackmakrophagen im Rahmen dieser Arbeit erstmals *in vivo* dargestellt und untersucht werden.

Durch die Verwendung transgener Mauslinien sollen gezielt Dottersackmakrophagen visualisiert werden. Hierbei sollen insbesondere Fragen in Hinblick auf die Entstehung, die Morphologie und das Proliferationsverhalten zu verschiedenen Zeitpunkten der murinen Embryonalentwicklung adressiert werden.

Außerdem soll das Expansionsverhalten von Makrophagenvorläuferzellen durch zeitlich punktuelle, genetische Markierung intravital analysiert werden.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit stellt die Untersuchung des Migrationsverhaltens der Makrophagen aus dem Dottersack in embryonale Zielorgane dar. Es soll untersucht werden, ob die Migration perivaskulär oder mit dem Blutstrom durch das Gefäßsystem erfolgt.

Zusätzlich gilt es die Frage des zeitlichen Ablaufs der Migration zu klären. Entscheidend dabei ist, ob die Einwanderung von Dottersackmakrophagen während der gesamten embryonalen Entwicklung oder innerhalb eines bestimmten Zeitfensters erfolgt.

IV. MATERIAL UND METHODEN

Um die Migration der Dottersackmakrophagen und ihren Vorläufern vom Beginn ihrer Entstehung im Dottersack bis zum Embryo zu verfolgen, wurde ein Modell zur *in vivo* Untersuchung an Mäusen etabliert. Im Folgenden werden die verwendeten Mauslinien beschrieben und nach welchen Kriterien diese ausgesucht wurden. Zusätzlich wird erläutert, mit welchen Methoden Makrophagen *in vivo* und *ex vivo* untersucht und analysiert wurden.

Alle Tierversuche wurden gemäß den Vorgaben des §8 des Tierschutzgesetzes durchgeführt (Fassung vom 18.05.2006, letzte Änderung am 18.07.2016 durch Artikel 4 Absatz 87) und von der zuständigen Behörde, der Regierung von Oberbayern, mit dem Aktenzeichen 55.2-1-54-2532-181-13 vom 07.05.2015 genehmigt.

1. Versuchstiere

Für die *in vivo* Versuche stellt die Maus unter anderem aufgrund ihrer geringen Größe ein geeignetes Versuchstier dar. Sie zeichnet sich mit einer Trächtigkeitsdauer von 17-21 Tagen, einer Wurfgröße von durchschnittlich 8-12 Jungtieren und durch schnelle Reproduktionsraten aus. Geringer Platzbedarf und damit einhergehende geringe Haltungskosten, als auch zahlreiche vorhandene transgene Mauslinien, sprechen für die Maus als Versuchstier. Ein weiterer Vorteil liegt in der guten Charakterisierung der gesamten Mausentwicklung. Aus immunbiologischer Sicht ist die Maus als Säugetier dem Menschen in zahlreichen physiologischen und pathologischen Prozessen sehr nahe – das heißt Erkenntnisse aus dem Mausmodell sind gut auf den menschlichen Organismus übertragbar und können somit als entscheidende Grundlage für mögliche Therapien dienen.

1.1. Mausmodelle

Es wurden acht Mauslinien verwendet, um Dottersackmakrophagen in der Entstehung, Migration und Entwicklung zu untersuchen. Die *Myb*^{-/-} Mauslinie, die von Jon Frampton an der University of Birmingham, England, zur Verfügung gestellt wurde [74], die C57Bl/6J Mauslinie, die von The Jackson Laboratory bezogen wurde, sowie die übrigen Tiere aus der Zucht im Zentrum für Neuropathologie und Prionenforschung der Universität München. Im Folgenden werden die Maus-

linien genauer charakterisiert:

1.1.1. Wildtypstamm C57BL/6J

Weibchen dieser Linie wurden für terminierte Verpaarungen mit homozygoten *Cx3cr1^{gfp/gfp}* Männchen verwendet, um heterozygote Embryonen analysieren zu können. Die für diese Versuche verwendeten Tiere stammen von der Firma „The Jackson Laboratory“. Der Wildtypstamm C57BL/6J, auch als „Black 6“ bekannt, ist die am Häufigsten genutzte Inzucht Linie und die erste Mauslinie deren Genom vollständig entschlüsselt wurde. Sie ist Grundlage allgemeiner transgener Mauslinien [135].

1.1.2. Fraktalkin-Rezeptor spezifische Mauslinien

Fraktalkin ist ein Chemokin das an den spezifischen transmembranen Fraktalkinrezeptor *Cx3cr1* bindet. *Cx3cr1* wird auf Monozyten, Dendritischen Zellen, Natürlichen Killerzellen und Makrophagen exprimiert. Durch direkte und indirekte Kopplung eines Fluoreszenzreporters an den Fraktalkin-Rezeptor besteht die Möglichkeit die Migration und Verbreitung von Makrophagen unter dem Fluoreszenzmikroskop zu visualisieren.

1.1.2.1. *Cx3cr1^{gfp/gfp}*

Diese Mäuse exprimieren das Reporterprotein eGFP (enhanced Green Fluorescent Protein) auf dem endogenen *Cx3cr1* Locus anstelle des Fraktalkin-Rezeptors [136]. Von dieser Linie wurden homozygote Männchen für terminierte Verpaarungen verwendet. Bei homozygoten Tieren wird auf beiden Allelen nicht der Fraktalkinrezeptor, sondern eGFP exprimiert, sodass bei diesen Tieren ein funktioneller Knockout des Chemokinrezeptors entsteht. Durch Verpaarung mit C57BL/6J Weibchen ist bei heterozygoten Nachkommen keine Einschränkung der Rezeptorfunktion gegeben.

1.1.2.2. *Cx3cr1^{gfp/+} Myb^{+/-}*

Myb ist ein für die definitive Hämatopoese essenzieller Transkriptionsfaktor. Homozygote Knockout Tiere sind nicht überlebensfähig und sterben um den Tag E16.5 aufgrund der ausbleibenden Hämatopoese an einer schweren Anämie [74]. Die Dottersackhämatopoese hingegen ist *Myb* unabhängig und bleibt den Embryonen erhalten [74, 75]. Durch eine gezielte Verpaarung von *Cx3cr1^{gfp/+}* Tieren mit *Myb*-Knockout Mäusen kann die definitive Hämatopoese in der F1 Generation

ausgeschaltet werden und gleichzeitig eGFP exprimierende Makrophagen untersucht werden. Für die Versuche wurden Männchen mit dem Genotyp $Cx3cr1^{gfp/gfp} Myb^{+/-}$ mit $Cx3cr1^{+/+} Myb^{+/-}$ Weibchen verpaart. Nach der Mendelschen Regel sind 25% der Nachkommen homozygote *Myb*-Knockout Tiere.





♂ \ ♀	+	-
+		
-		

Abbildung 5 Schematischer Erbgang aus Verpaarungen von *Myb*^{+/-} Elterntieren

Rot: intakte Hämatopoese, Grau: Ausprägung einer Anämie infolge fehlender Knochenmarkshämatopoese

Diese Knockout Embryonen sind aufgrund der ausbleibenden Blutbildung aufgrund der Anämie ab ca. E13.5 optisch von ihren Wurfgeschwistern zu unterscheiden. Zusätzlich wird mittels entnommener Gewebeproben in Form der Schwanzspitze eine Genotypisierung durchgeführt. Tiere der *Myb*-Linie wurden von Jon Frampton bezogen [74].

1.1.2.3. *Cx3cr1*-Cre Rosa26mT/mG

In dieser Linie wird der rote membranöse Fluoreszenzfarbstoff „*tomato*“ ubiquitär exprimiert. Erst die Expression einer Cre-Rekombinase führt zu einem Fluoreszenzfarbstoffwechsel von rot (membranöses tomato) zu grün (membranöses GFP). Im hier verwendeten Mausmodell ist die Expression der Cre-Rekombinase an den Fraktalkin-Rezeptor gekoppelt, sodass der vorangehend beschriebene Fluoreszenzfarbstoff nur in Zellen auftritt, die den Fraktalkin-Rezeptor exprimieren. Diese können somit gezielt identifiziert und fluoreszenzmikroskopisch beobachtet werden [137].

1.1.3. *Csflr*-Cre

Dottersackmakrophagen entwickeln sich aus erythro-myeloiden Progenitorzellen

(EMPs) [35, 128]. Diese Progenitorzellen exprimieren auf ihrer Oberfläche den *colony stimulating factor 1* Rezeptor (Csflr). An den Csflr-Promoter ist die Cre-Rekombinase gekoppelt. Nach der Verpaarung von *Csflr-Cre* Weibchen mit Rosa26-YFP Reportertieren exprimieren alle Csflr-positiven Zellen, in denen der Csflr-Promoter aktiv ist, YFP. Auf diese Weise können frühe Makrophagen fluoreszenzmikroskopisch visualisiert werden [138].

1.1.4. Csflr-MerCreMer

Tiere der *Csflr-MerCreMer* Mauslinie exprimieren das durch Tamoxifen induzierbare MerCreMer Fusionsprotein unter Kontrolle des Csflr Promoters, welcher auf Makrophagen-Progenitorzellen exprimiert wird. Durch dieses Mausmodell kann eine Cre-Rekombinase in Csflr-positiven Zellen zeitlich limitiert exprimiert werden. Dies gelingt durch genetische Kopplung der Cre-Rekombinase an einen mutierten murinen Östrogenrezeptors (Mer, Murine Estrogen Receptor). Dieser kann den synthetischen Östrogenantagonisten 4-Hydroxytamoxifen (4-OHT), nicht aber 17 β -Estradiol (E2) binden [139]. Durch die intraperitoneale Injektion von 75 μ g 4-OHT ((Z)-4-Hydroxytamoxifen 25mg, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) pro Gramm Körpergewicht an Tag 8.5 in die trächtige, mit einem Rosa26YFP Männchen, verpaarte Maus, wird die Aktivität der Cre-Rekombinase in Csflr positiven Zellen transient induziert. Sie schneidet das durch zwei *loxP-Sites* flankierte STOP-Codon vor dem YFP Locus heraus. Somit wird in der betroffenen Csflr-positiven Zelle und in allen Tochterzellen YFP exprimiert [139-142].

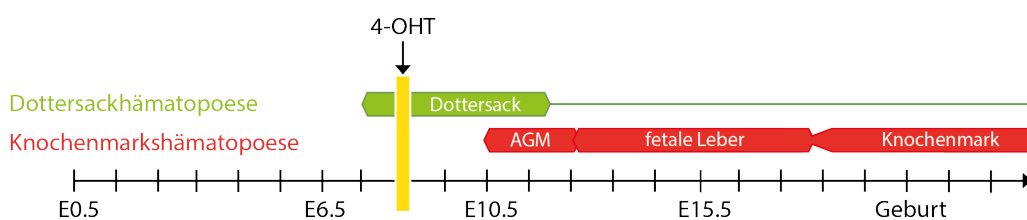


Abbildung 6 4-OHT Injektion vor dem Einsetzen der definitiven Hämatopoese an Tag E8.5

1.1.5. Rosa26-YFP

Männchen dieser Linie wurden als Reportertiere zur Verpaarung mit *Csflr-MerCreMer*, sowie *Csflr-Cre* Weibchen eingesetzt. Diese Reportermäuse besitzen eine *loxP* flankierte STOP-Sequenz, gefolgt von einem gelb fluoreszierenden

Protein-Gen (YFP) im *Gt(ROSA)26Sor* Locus. Verpaart mit Mäusen, die eine Cre-Rekombinase exprimieren, wird die STOP-Sequenz herausgeschnitten und das gelb fluoreszierende Protein in den Cre-Rekombinase exprimierenden Zellen sichtbar [143].

1.2. Tierhaltung

Weibliche C57Bl/6J Tiere wurden von *The Jackson Laboratory* bezogen, die übrigen Tiere zunächst in einem externen SPF-Tierstall (Specific Pathogen Free) gezüchtet und anschließend in den Tierstall des Walter-Brendel-Zentrums befördert. Hier richtet sich die Haltung nach den FELASA-Hygienestandards (Federation of European Laboratory Animal Associations). Vierteljährlich wird mit Hilfe von Sentinel Mäusen ein Hygienemonitoring nach FELASA Richtlinien durchgeführt.

Die Stress- und Keimbelastung der Mäuse wird durch wöchentliche Reinigung des Stalles und Erneuerung der Käfige, sowie durch limitierten Personenverkehr reduziert. Das Öffnen der Käfige und Umsetzen der Mäuse ist nur unter der dafür vorgesehenen Käfigwechselstation (Tecniplast, Varese, Italy) erlaubt, wenn die Frontluftbarriere 30m/s erreicht hat. Zugangsberechtigte Personen gelangen nur mit einem Transponder nach Händedesinfektion und nach Anlegen von Schutzkleidung inklusive Mundschutz in der dafür vorgesehenen Schleuse in den Tierstall. Von der Tierhaltung zur Schleuse herrscht ein fallender Druckgradient, um auch so die Keimbelastung in der Haltung zu reduzieren. Verwendet werden Makrolon-Käfige Typ II long (Greenline IVC SealsavePLUS, Tecniplast, Buguggiate, Italy) mit einer Nutzfläche von 501cm² in einem IVC System (Individually Ventilated Cages). In den Käfigen werden gewichtsabhängig ein bis maximal vier Mäuse gehalten. D.h. in einer Gruppenhaltung bei Tieren >20g Körpergewicht sitzen maximal drei Tiere pro Käfig. Alleine werden nur die für die terminierte Verpaarung vorgesehenen Männchen gehalten. Diese, einmal getrennt, dürfen aufgrund ihres Revier- und Konkurrenzverhaltens nicht mehr mit anderen Männchen zusammengesetzt werden. Innerhalb der Käfige wird ein Mikroklima von 22±1°C und eine relative Luftfeuchtigkeit von 55±5% durch die Gebläseeinheit (SmartFlow, Tecniplast) aufrechterhalten. Die Einhaltung der Werte wird täglich überprüft. Pelletiertes Alleinfuttermittel (Sniff Spezialdiäten GmbH, Soest) und Wasser aus Tränkeflaschen stehen den Tieren ad libitum zur Verfügung. Als Be-

schäftigungsmaterial wird den Mäusen grobe Einstreu (Abbed Nestbaumaterial B-E011, Faserbreite 3,5mm, E-012, Faserbreite 4mm + NBU E014, Faserbreite 120mm), Maushäuschen aus Tonkarton, Holzwolle, Nestlets, sowie Kosmetiktücher (facial tissues supersoft WEPA Professional GmbH, Arnsberg) zum Nestbau zur Verfügung gestellt. Im Tierstall ist über eine Zeitschaltuhr ein konstantes Lichtregime mit einer Hell- und Dunkelphase von jeweils 12 Stunden gewährleistet. Während der Hellphase werden 100 Lux erreicht.

Nach Ankunft der Tiere im Tierstall haben sie eine Eingewöhnungsphase von sieben Tagen bevor mit den terminierten Verpaarungen begonnen wird. So wird sichergestellt, dass sich die Mäuse von dem Stress den sie durch den Transport und die Eingewöhnung an die neue Umgebung ausgesetzt waren, erholen können.

Die Weibchen, die Hydroxytamoxifen (4-OHT) erhalten, bekommen den Wirkstoff durch eine intraperitoneale Injektion um 13:00 Uhr an E8.5. Für die Injektion werden 25mg 4-OHT zunächst in 625µl 100%-igem Ethanol in einem 2ml Eppendorf Tube gelöst. Dafür wird es bei höchster Geschwindigkeit mit Hilfe des Vortexers geschüttelt, für 10 Minuten auf 60°C erwärmt und anschließend nochmals geschüttelt. Anschließend wird dem 4-OHT-Ethanol Gemisch 625µl Cremophor (Kolliphor EL, Sigma-Adrich Chemie GmbH, Steinheim) zugegeben um eine Konzentration von 2mg/100µl zu erhalten. Nach schütteln auf höchster Stufe wurde die Lösung auf 100µl aliquotiert und die Aliquots bei -20°C aufbewahrt. Zur Verabreichung der Lösung wurde ein Aliquot aufgetaut, mit sterilem PBS verdünnt und, abhängig vom Gewicht der Maus, in einem Volumen von maximal 250µl appliziert.

Die Weibchen werden nach der Applikation engmaschig anhand von Score Sheets kontrolliert (Abbildung 7). Ab dem Tag der 4-OHT Injektion werden die Tiere auf Allgemeinbefinden, Nahrungsaufnahme, Verhalten, Trächtigkeit sowie auf Zeichen eines Aborts oder vaginaler Blutungen untersucht. Vergeben werden bei der Untersuchung 0-2 Scores, wobei 0 „ohne besonderen Befund“ entspricht. Bei Erreichen von Score 2, entweder kumulativ von zweimaliger Vergabe von Score 1 oder direkt Score 2, wird der Versuch abgebrochen und das Tier euthanasiert.

Score System für den Tierantrag "Zelluläre Identität und Funktion von Dottersack-Makrophagen im embryonalen Mausorganismus"																																										
Versuchsabschnitt Tamoxifengabe in trächtigen Mäusen																																										
Datum Beginn des Tierversuchs:		Tier-Identifikations-Nummer:		Tier-Alter bei Versuchsaufnahme:		Körpergewicht (kg) am Tag 0,5:																																				
Scorezeitpunkt (NZP) Beginn bei Beobachtung des Vaginalpfropfs:								<table border="1"> <tr> <th>Uhrzeit:</th> <th>05.5</th> <th>06.5</th> <th>07.0</th> <th>07.5</th> <th>08.0</th> <th>08.5</th> <th>09.0</th> <th>09.5</th> <th>10.0</th> <th>10.5</th> <th>11.0</th> <th>11.5</th> <th>12.0</th> </tr> <tr> <th>Datum:</th> <td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td> </tr> </table>							Uhrzeit:	05.5	06.5	07.0	07.5	08.0	08.5	09.0	09.5	10.0	10.5	11.0	11.5	12.0	Datum:													
Uhrzeit:	05.5	06.5	07.0	07.5	08.0	08.5	09.0	09.5	10.0	10.5	11.0	11.5	12.0																													
Datum:																																										
Parameter	Score 0	Score 1	Score 2																																							
Algem. Befinden	akt. (normale Aktivitäten, z.B. Fressen, Ruhen, Bewegen)	Atrophiert (gemittelter Rücken, gestauchtes Fell, Bewegung sehr verlangsamt)	stark atrophiert (Defekter, apathisch, keine Körperberührung, flache oder Punktschulter-Schwellungen)																																							
Nahrungsaufnahme	Trinkwasser (Körpergewicht erhalten)	verminderte Nahrungsaufnahme < 20% (Körpergewicht < 20% vermindert)	verminderte Nahrungsaufnahme über mehr als 20% (Körpergewicht < 20% vermindert)																																							
Verhalten	Neugierig, interessiert an der Umgebung, munter	Gesamtheit an der Umgebung	Apathisch, abgesondert, Bewegungsautomatization																																							
Schwangerschaft intakt	normal	entfällt (Score 1 oder 2)	Zeichen eines Aborts, z.B. vaginale Blutung																																							

Abbruchkriterien: bei Score 2 oder drei Mal Score 1 erfolgt unmittelbar der Versuchabbruch bei nicht Einsetzen der Geburt erfolgt am Tag 21 (nach Detektion des Vaginalpfropfs) eine Sectio caesarea
 * erstellt in Anlehnung an den Vortrag von PD Dr. med. vet. Dr. habil. Udo Meyerle-Kretz, "Mikroinjectionen aus wissenschaftlicher Sicht" bei der 2. Fortbildungsveranstaltung für Tierärztliche Fortbildung, 28. Mai 2008

Abbildung 7 Score Sheet für den Versuchsabschnitt Tamoxifengabe in trächtigen Mäusen

1.3. Terminierte Verpaarung

Um die Entwicklung von Makrophagen im intra- und extraembryonalen Gewebe untersuchen zu können, ist es notwendig nach den verschiedenen Entwicklungsstadien der Embryonalentwicklung zu unterscheiden und diese gezielt zu untersuchen. Mit Hilfe von terminierten Verpaarungen und sonographischer Bestätigung einer bestehenden Trächtigkeit können die Embryonen zum gefragten Alter der Embryonalentwicklung in den Versuch genommen werden. Verwendet wurde für die sonographische Untersuchung ein portables Ultraschallgerät (MyLab One, Easote Biomedica Deutschland GmbH, Köln) mit einem Linearschallkopf Typ SL3116. Zusätzlich wird während der Versuche das embryonale Entwicklungsstadium nach Theiler überprüft.

Mäuse verpaaren sich in der Regel in der Nacht [144]. Ein bis zwei Weibchen des gewünschten Genotyps werden für 14 Stunden, von 18:00 Uhr abends bis 08:00 Uhr morgens des folgenden Tages, zu dem entsprechenden Männchen in den Käfig gesetzt. Fand eine Verpaarung statt, weist das Weibchen am folgenden Morgen einen Vaginalpfropf auf. Dieser kann bis zu 24 Stunden nach der Verpaarung erhalten bleiben und besteht aus dem Sekret der Glandula vesicularis und der Prostata des Bocks [144, 145]. Der Tag an dem ein Pfropf sichtbar ist, wird als Tag 0.5 der Embryonalentwicklung (E0.5) post coitus registriert. Zur Standardisierung wird 01:00 Uhr als Zeitpunkt der Verpaarung festgelegt. E0.5 ist demnach mittags um 13:00 Uhr. Da ein positiver Vaginalpfropf kein sicheres Zeichen einer Trächtigkeit ist, wird mittels Sonografie an Tag E9.5 überprüft, ob eine Trächtig-

keit besteht. Die trächtigen Weibchen werden anschließend an den gewünschten Tagen in den Versuch genommen. Während des Versuchs wird zusätzlich die Anzahl der Somiten nach den Theiler Staging-Kriterien im Embryo bestimmt, um den angenommen Zeitpunkt der Embryonalentwicklung zu verifizieren. Somiten entwickeln sich im Embryo durch Abknospung des somitischen Mesoderms, das sich zunächst paraxial der Chorda dorsalis gebildet hat. Somiten sind die Grundlage für die Entwicklung des Sklerotoms, aus dem sich das Skelett differenziert [146]. Die untersuchten Zeitpunkte sind E8.5, E9.5, E10.5, E12.5 und E16.5. Nach Theiler entspricht Tag E8.5 Stadium 13-14. In diesem Stadium besitzt der Embryo 11-13 Somitenpaare. Der folgende Tag wird als Stadium 15 definiert. In der Entwicklung liegt die Zahl der Somiten bei 20-25 Paaren. E10.5 entspricht dem Theiler Stadium 17 mit etwa 35 Somitenpaaren. Mit etwa 52 Somitenpaaren ist E12.5 als Stadium 20-21 definiert. An Tag 16.5 ist eine Bestimmung der Somiten nicht mehr möglich. Äußerliche Merkmale, die für dieses Entwicklungsstadium charakteristisch sind, sind unter anderem die Haut, die distal der Carpal- und Tarsalgelenke, sowie im Nacken deutliche Falten wirft. Superficiale Venen, die in früheren Stadien in der fast transparenten Haut sichtbar waren, sind durch die dicke Haut nicht mehr erkennbar. Die Oberlippen weisen in diesem Stadium Vibrissen-tragende Bereiche auf. Die Augenlider sind verschmolzen. Im Hinblick auf die Zehen ist der erste Phalanx kürzer als die übrigen Zehen, die zu diesem Zeitpunkt weitestgehend parallel zueinander ausgerichtet sind [147].

2. Intravitalmikroskopie

Mit Hilfe des Intravitalmikroskops können die fluoreszierenden Dottersackmakrophagen und die Vorläufer im Dottersack und Embryo verfolgt werden (Abbildung 8). Im Folgenden werden die Narkose, der Versuchsaufbau und das verwendete Epifluoreszenzmikroskop beschrieben.

2.1. Narkose

Für die Isolation der Embryonen, umgeben vom intakten Dottersack, wird eine Sectio caesarea an den trächtigen Mäusen durchgeführt. Die Tiere werden für diesen Eingriff in tiefe Vollnarkose gelegt. Die Narkoseeinleitung erfolgt mittels 5.0 Vol. % Isofluran (Isofluran CP cp pharma, Burgdorf) und bei einer inspiratorischen Sauerstofffraktion von 0.35l/l Sauerstoff in einer durchsichtigen Plexiglas-

röhre mit Sauerstoff-Isofluranzufuhr auf der einen und Abzug auf der anderen Seite. Nach Ausfall des Stellreflexes wird die Maus aus der Röhre entnommen und bekommt mittels einer 26G Kanüle (BD Mikrolance Becton Dickson GmbH, Franklin Lakes, USA) intraperitoneal eine Tripelnarkose injiziert. Die Tripelnarkose soll den unter dem Begriff der Allgemeinanästhesie definierten Zustand der Analgesie, Relaxation und Hypnose gewährleisten und bestand aus Fentanyl, Medetomidin und Midazolam.

Das synthetische Opioid Fentanyl (Fentadon, Albrecht GmbH, Aulendorf) bindet als Opiat-Agonist an μ -Opioidrezeptoren und hat eine zentrale Wirkung. [148] Es wurde zur perioperativen Schmerzausschaltung mit einer Dosierung von 0,05mg/kg Körpergewicht verwendet.

Medetomidin (Dorbene, Pfizer GmbH, Berlin) ist ein vergleichsweise spezifischer α_2 Agonist (10-mal mehr als Xylazin) und wirkt sedativ, analgetisch als auch muskelrelaxierend da es im Rückenmark die interneurale Reizübertragung hemmt [148]. Mit einer Dosierung von 0,5mg/kg war es Bestandteil der Injektionsnarkose.

Als Benzodiazepin wurde Midazolam (Midazolam, B. Braun, Melsungen) mit 0,5mg/kg verabreicht. Im Thalamus, Hypothalamus und teilweise im limbischen System bindet es an spezifische Benzodiazepinrezeptoren wo es beruhigend und anxiolytisch wirkt. Zusätzlich erzielt Midazolam an der Formatio reticularis als auch dem Rückenmark eine muskelrelaxierende Wirkung. [148]

Zum Schutz der Hornhaut der Augen vor Austrocknung wurde während des Versuches 5%-ige Dexpanthenol Salbe (Bepanthen Augen- und Nasensalbe, Bayer Vital GmbH, Leverkusen) aufgetragen. Mit einer Rektalsonde und einer Wärmepatte die beide mit dem Temperatur-Kontrollmodul TKM-0904 verbunden sind, konnte kontinuierlich die Körpertemperatur überwacht und reguliert werden.

Da die intravitalmikroskopischen Versuche eine Dauer von bis zu vier Stunden betragen konnten, wurde in regelmäßigen Abständen der Flexorreflex und damit die notwendige Narkosetiefe überprüft und alle 45 Minuten eine halbe Dosis der Tripelnarkose nachinjiziert.

2.2. Sectio caesarea

Nach dem Erlöschen des Zwischenzehenreflex wurde die Maus für die Operation auf dem Rücken auf die Wärmeplatte platziert, die Vorder- sowie Hintergliedmaßen mit Medizinischem Pflaster (Transpore, 3M Deutschland GmbH, Neuss) fixiert und die Rektalsonde eingeführt. Unter einem Stereomikroskop (Stemi-2000-C, Zeiss, Jena) und einer Kaltlichtquelle (Schott-Kaltlichtquelle KI200, Zeiss, Jena) wurde die Bauchdecke entlang der Linea alba eröffnet, ein Uterushorn nach dem anderen vorverlagert und daraus die Embryonen mit intaktem Dottersack exponiert. Verwendet wurde mikrochirurgisches Besteck (Fine Science Tools GmbH, Heidelberg). Der Embryo, umgeben vom intakten Dottersack, wurde zusammen mit der Plazenta entnommen und in 38°C warme phosphatgepufferte Kochsalzlösung (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, PBS, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) in eine 6-Kammer Keramikplatte auf eine Heizplatte (Hot Plate 100 mit HP100 Hot Plate Controller, Labotect GmbH, Rosdorf) unter das Mikroskop Objektiv überführt.

2.3. Epifluoreszenzmikroskop

Das Prinzip der Fluoreszenzmikroskopie beruht auf der Anwesenheit von Fluorochromen die Licht aussenden, wenn sie in einen elektronisch angeregten Zustand versetzt werden. Werden Fluorochrome mit Licht bestimmter Wellenlänge bestrahlt, versetzt das Anregungslicht die Elektronen in einen angeregten Zustand. Kehren diese in ihren Grundzustand zurück, emittieren sie die dabei freiwerdende Energie als Licht längerer Wellenlänge.

Beim Fluoreszenzmikroskop dient eine Xenonlampe als Lichtquelle, um Licht in der nötigen Intensität und dem relevanten Wellenlängenbereich für die Anregung zu erzeugen. Das Anregungslicht muss für die Darstellung des Präparates vom emittierten Fluoreszenzlicht getrennt werden. Hierfür wird das ausgesandte Licht zunächst durch Kollimatorlinsen gebündelt und das Lichtspektrum durch Anregungsfilter eingeengt. Der dichroitische Teilerspiegel, undurchlässig für Licht kürzerer Wellenlänge, lenkt nun durch seine 45° Ausrichtung das Licht in Richtung des Objektivs und somit auf das Präparat. Die im Präparat enthaltenen Fluorochrome werden angeregt und emittieren wiederum Licht, das als Fluoreszenzlicht vom Objektiv aufgenommen wird und von dort auf den Teilerspiegel trifft. Anders als beim Anregungslicht kann das emittierte Licht durch seine längere Wellenlänge nun den Teilerspiegel passieren und trifft auf den Emissionsfilter.

Ähnlich dem Anregungsfilter engt dieser das Licht in seinem Spektrum ein und erzeugt somit ein deutlicheres Signal zur Darstellung des Objektes [149]. Zur Darstellung des GFP Signals der Makrophagen wurde der NIBA Filter gewählt. Für die Exzitation des Signals liegt der Wellenbereich des Anregungsfilters bei 470-495nm. Der Bereich des Emissionsfilters beträgt 510-550nm. Das emittierte Licht wird von einer CCD Kamera (Charge Coupled Device, ORCA-ER, Hamamatsu, Japan) aufgenommen und an einen Computer geleitet. Mit Hilfe der cellR Imaging Software (Olympus Deutschland GmbH, Hamburg) können die Live Bilder aufgezeichnet und Schnappschüsse erstellt werden.

2.4. Durchführung

Untersucht wurden Embryonen an Tag 9.5, 10.5, 12.5 und 16.5 der murinen Embryonalentwicklung. Dottersackgefäße von durchschnittlichem Durchmesser wurden unter dem Olympus BX51W1 Epifluoreszenz Mikroskop mit einem Plan N 10x/0.25 Objektiv für drei bis 15 Minuten im Zeitraffer (Bild alle 450ms) mit Hilfe der cell R imaging Software gefilmt. Die maximale Aufzeichnungszeit eines Embryos betrug bis zu 45 Minuten. Anschließend wurde das Muttertier sowie die Embryonen euthanasiert.

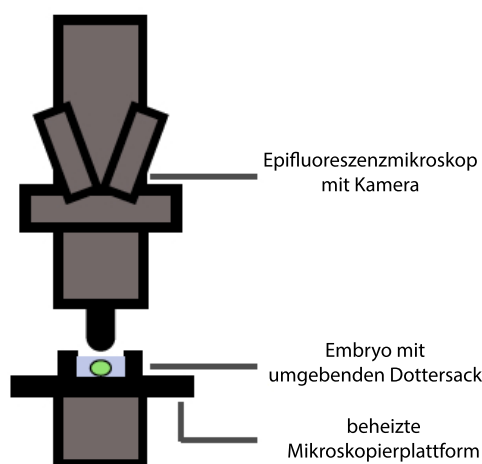


Abbildung 8

Epifluoreszenzmikroskop

Abgebildet ist eine Schemazeichnung eines Epifluoreszenzmikroskops, welches für die intravitale Mikroskopie verwendet wurde. Der Embryo wurde mit umgebenden Dottersack auf einer beheizten Mikroskopierplattform untersucht.

2.5. Spinning-Disk-Konfokalmikroskopie

Das aufrechte „Spinning-Disk“ Konfokalmikroskop (Examiner, Zeiss) zusammen mit einer konfokalen Scanner Einheit CSU-X1 (Yokogawa Electric Corporation, Japan) wurde ebenso für die *in vivo* Echtzeit Analyse von Dottersackmakrophagen

genutzt. Vorteil ist die höhere räumliche Auflösung der Makrophagen um morphologische Eigenschaften noch besser visualisieren zu können. Der höhere Kontrast der Bilder wird durch die Besonderheit dieses Mikroskops erreicht: Der Laser mit dem Anregungslicht trifft auf eine Scheibe, die mit Mikrolinsen durchsetzt ist. Dadurch kann Streustrahlung nicht auf das Objekt gelangen. Durch die Mikrolinsen wird das Licht zusätzlich fokussiert und trifft auf die zweite Scheibe, in der viele Löcher eingebracht sind. Diese Scheibe rotiert mit einer hohen Geschwindigkeit, sodass das fokussierte Licht durch das Objektiv auf das gesamte Objekt trifft. Das von dem Objekt emittierte Licht gelangt durch sogenannte Pinholes auf einen dichroischen Spiegel, der nur das emittierte Licht höherer Wellenlänge durchlässt und lenkt es, gebündelt durch eine nachgeschaltete Linse, auf eine CCD Kamera (Evolve, Photometrics, USA). Aufgenommen werden die Makrophagen durch ein 20x/ 1.0 NA oder einem 63x/ 1.0 NA Wasser Immersionsobjektiv (Plan Apochromat, Zeiss). Zur Anregung des GFP-, beziehungsweise Tomato-Signals in den Makrophagen wurde ein Laser mit einer Wellenlänge von 488nm (GFP), bzw 561nm (Tomato) genutzt. Die trächtigen Weibchen werden auch hier in tiefe Narkose gelegt und die *Cx3cr1^{Cre} Rosa26^{mT/mG}* Embryonen mit einem Alter von E9.5 und E10.5, wie zuvor beschrieben, aus dem Muttertier isoliert. Die Analyse der Aufnahmen erfolgt mit der Slidebook 6.0.11 Software (3i, USA) als auch Fiji (NIH, USA).

3. Genotypisierung

Da die Wurfgeschwister aus Verpaarungen von *Cx3cr1^{gfp/+}* und *Cx3cr1^{gfp/gfp}* Elterntieren phänotypisch nicht voneinander zu unterscheiden sind, wird eine Genotypisierung der Embryonen durchgeführt. Bei der Verpaarung von *Cx3cr1^{gfp/+}* Weibchen mit homozygoten *Cx3cr1^{gfp/gfp}* Männchen zeigt die F1 Generation nach Mendelscher Regel mit einer Wahrscheinlichkeit von 50% eine heterozygote Expression von GFP und 50% des Wurfs homozygote Expression für GFP an dem Fraktalkinrezeptor.

Bei der Verpaarung von *Cx3cr1^{+/+} Myb^{+/-}* Weibchen mit *Cx3cr1^{gfp/gfp} Myb^{+/-}* Männchen sind an E16.5 deutlich anämische und somit Knockout-Tiere bereits am Phänotyp erkennbar. Dennoch wird auch hier eine Genotypisierung zur Bestätigung durchgeführt. Für die DNA-Isolation wird nach erfolgter Intravitalmikro-

skopie ein Stück des Schwanzes entnommen. Dieses wird nach dem Standard Protokoll des DNeasy Blood & Tissue Kits (Lot 154037281, Qiagen GmbH, Hilden) für mindestens vier Stunden lysiert und die DNA isoliert. Im nächsten Schritt wird die DNA mittels der Polymerase Kettenreaktion (PCR, polymerase chain reaction) nach den für die jeweiligen Zielsequenzen (Genabschnitten) notwendigen Protokollen im Thermal Cycler (Veriti 96 Well, Applied Biosystems, Foster City USA) vervielfältigt. Die Genotypisierung erfolgt mittels Gelelektrophorese. Hierfür werden die DNA Proben jeweils auf 1,5% bzw. 2,5% starkes Agarose-Gel aufgetragen. Bei der Analyse der *Myb*-Knockout Tieren fehlt die Wildtyp-Bande von 200 Basenpaaren. Die Mutante weist 300 Basenpaare auf. Heterozygote Tiere zeigen beide Banden (Abbildung 9).

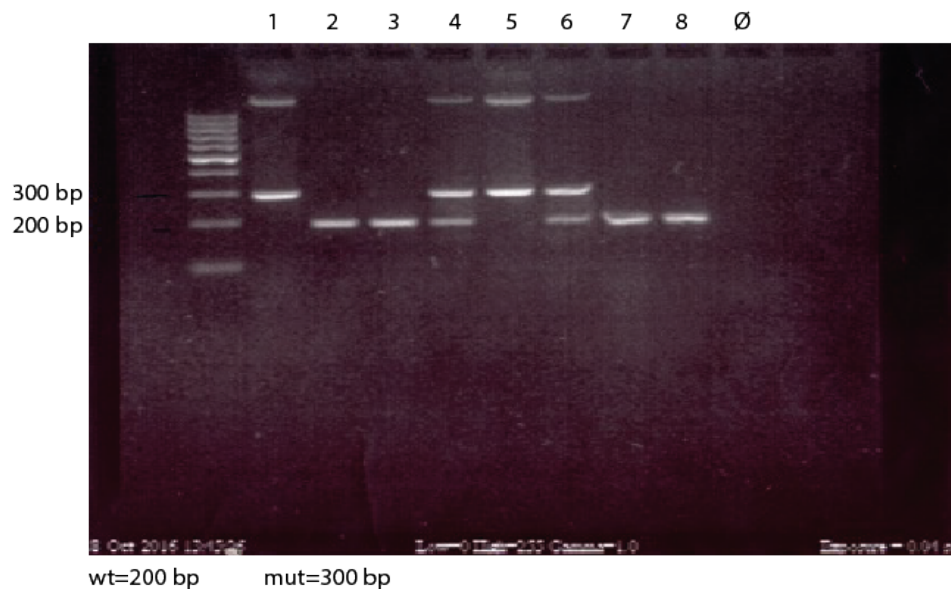


Abbildung 9 Genotypisierung eines E12.5 Wurfes von *Cx3cr1 Myb*^{+/-} Elterntieren

Die Embryonen mit den Nummern 1 und 5 sind homozygote *Myb*-Knockout Tiere. Embryo Nr. 4 und 6 sind heterozygot. Alle übrigen Tiere zeigen keine Mutation des *Myb*-Lokus.

4. Durchflusszytometrie

Mit dieser Technologie können in Fluoreszenz markierten Zellproben Zellpopulationen anhand ihrer Größe, Granularität sowie Fluoreszenz sortiert und quantitativ erfasst werden. Hiermit wird die Anzahl von Dottersackmakrophagen in den Or-

ganen von Embryonen mit unterschiedlichen Genotypen als auch Knockout-Modelle mit Wildtyp-Tieren verglichen. Zudem können Dottersackmakrophagen aus dem jeweiligen Gesamtgewebe gezielt isoliert und phänotypisch charakterisiert werden. Dies erlaubt Rückschlüsse auf die Entwicklung und spezifische Funktion der Makrophagenpopulation. Die folgenden Kapitel beschreiben die Vorbereitung des embryonalen Gewebes für die Durchflusszytometrie und überblicksweise die Funktionsweise des Durchflusszytometers.

4.1. Vorbereitung

Das Dottersackgewebe wird für 20 Minuten in einem Enzymmix, bestehend aus Collagenase D in einer Konzentration von 1mg/ml (Roche), 100U/ml Desoxyribonuklease 1 (DNase 1, Sigma), sowie Dispase (Invitrogen) in einer Konzentration von 2,4mg/ml verdünnt in 5ml PBS, bei 37°C (Eppendorf ThermoMixer® comfort) verdaut. Nach Zentrifugation der Proben bei 4°C, 400G für 5 Minuten, wird der Überstand verworfen, die Zellpellets mit 1%-iger BSA-Lösung (Bovines Serum Albumin, PAA Laboratories, Pasching, Österreich) durch ein 100µm Falcon® cell strainer gefiltert und nochmals mit 4°C kalter, 1%-iger BSA Lösung gewaschen. BSA ist ein Serum Albumin, das aus dem Blut von Kühen gewonnen wird. Seine antiadhäsiven und Eigenschaften helfen dem Verklumpen der Zellen in Lösung entgegenzuwirken und dienen der Ernährung sowie der damit einhergehenden verlängerten Lebensdauer der Zellen. Nach erneuter Zentrifugation wird abermals der Überstand verworfen, die Zellpellets mit 100µl 1%-igem BSA gelöst und auf einer 96-Well Platte verteilt. Mit einer immunhistochemischen Fluoreszenzfärbung können Proteine auf der Zelloberfläche spezifisch markiert werden. Dabei verwendet man mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte Antikörper (AK) die mit den spezifischen Epitopen auf der Zelle Antikörper-Antigen-Komplexe bilden. Die Zellen werden mit 50µl Antikörpermix, bestehend aus einer 1:300 Verdünnung in 1%-igem BSA, für das Durchflusszytometer (Beckman Coulter Mo-Flow Astrios) für 20 Minuten gefärbt. Nach der Färbung werden sie erneut mit 1%-igem BSA gewaschen, ab zentrifugiert, aus der Well-Platte mit 1%-igem BSA gelöst und in FACS Röhrchen verteilt und zu einem Gesamtvolumen von 400µl aufgefüllt.

Zur Markierung der Zellen werden ausschließlich Primärantikörper mit folgenden Fluorochromen verwendet:

Tabelle 1 Verwendete Antikörper bei der Durchflusszytometrie

Oberflächen- marker	Fluorochrom	Clone	Max. Exzitation / Emission (nm)
CD45.2	FarRed (APC-Cy7)	104 (BD Pharmingen)	650/ 785
F4/80	Brilliant Violet (BV421)	BM8 (Biolegend)	407/ 421
M-Csflr (CD115)	PE	AFS98 (Biolog-end)	488-561/ 607

Zusätzlich zu den Antikörpern, wird bei den mit *Cx3cr1^{gfp/+}* Tieren durchgeführten Versuchen das GFP Signal (Emission 494/Exzitation 518nm) aufgezeichnet.

4.2. Durchflusszytometer

Die Zellen aus den Proben werden durch das Durchflusszytometer (BD LSRFortessa, BD Bioscience) aufgenommen und passieren einzeln einen Laserstrahl. Trifft das Licht auf die Zellen, wird es in unterschiedlichen Winkeln von seiner Achse abgelenkt. Der Streuwinkel entlang der Lichtachse hängt von Zellgröße und –volumen, sowie dem Brechungsindex der umgebenden Flüssigkeit ab. Die abgelenkten Strahlen werden als sogenanntes Vorwärtstreulicht („Forward Scatter“; FSc) registriert. Anhand der jeweiligen Streuwinkel und –intensitäten der einzelnen Zellen, wird zwischen großen und kleinen Zellen unterscheiden.

Korpuskuläre Bestandteile im Zellinneren, wie z.B. Granula, reflektieren und brechen das Licht in alle Richtungen. Zur Vereinfachung werden hier die Strahlen, die im 90°-Winkel abgelenkt werden, auf einen Photomultiplier oder auch Photoelektronenvervielfacher geleitet. Dieser verstärkt die Signale der seitlichen Lichtstreuung und erfasst diese als Seitwärtstreulicht („Side Scatter“, SSc). Mit Hilfe dieser Erfassung können Zellen mit hoher Granularität, wie Granulozyten vorselektiert werden.

Zusätzlich werden Zellen, die vorher konjugierte Antikörper gebunden haben, anhand des emittierten Lichts weiteren Zellpopulationen zugeordnet. Werden mehrere konjugierte AK mit verschiedenen Fluorochromen gleichzeitig einer Probe zugefügt, müssen diese an verschiedene spezifische Strukturen der Zelle binden und die Fluorochrome müssen sich in ihrem Emissionsspektrum unterscheiden. Passieren die Zellen den Laserstrahl, werden die Fluorochrome angeregt und

emittieren wiederum Licht. Durch ein System aus Spiegeln und entsprechenden Filtern werden die emittierten Strahlen nach ihren Spektren getrennt und durch PMTs quantitativ erfasst. Um die Palette an Fluoreszenzfarbstoffen noch zu erweitern, werden Tandem-Farbstoffe (z.B. APC-Cy7) benutzt. Das emittierte Licht des ersten Fluorochroms regt den zweiten Farbstoff an. Das entstehende Licht des zweiten Fluorochroms wird dann vom PMT erfasst. Da sich die Emissionsspektren verschiedener konjugierter AK mehr oder weniger überschneiden werden die verschiedenen Farben vorher als Einzelfärbungen gemessen. Somit werden die Emissionsmaxima der jeweiligen Farbstoffe bestimmt, und Überschneidungen in den Spektren kompensiert.

Dargestellt werden die erfassten Daten mittels Histogrammen oder sogenannten Scatter Plots. Das Histogramm dient zur Darstellung eines Parameters und gibt eine quantitative Aussage über einen bestimmten Marker in einer Zellpopulation. Die x-Achse zeigt die Intensität des aufgenommenen Signals, während die Anzahl der Zellen die dieses Signal aufzeigen auf der y-Achse abgebildet werden.

Im Dot Plot werden zwei Parameter gegeneinander dargestellt und die jeweiligen Zellen als einzelne Punkte. Das erlaubt die Identifikation von individuellen Subpopulationen in einer Zellprobe.

Die erfassten Daten werden anhand der Software FlowJo[®] 10.07 (Tree Star) analysiert. Zunächst wurden CD45 und Cx3cr1-GFP positive Zellen aus der Gesamtpopulation herausgefiltert. Anschließend erfolgte eine Darstellung der F4/80 und CD115 (Csf1r) Expression.

5. Whole Mount Färbung

Während der intravitalmikroskopischen Untersuchung von Dottersackmakrophagen ab dem Tag E9.5 fiel eine enge Assoziation der Zellen zum Gefäßnetzwerk auf. Zur besseren Darstellung und Überprüfung der Entwicklung von Gefäßen, wurden Dottersäcke als Kompletpräparate („Whole Mounts“) von E8.5 und E10.5 alten Embryonen mittels Immunfluoreszenz gefärbt. CD31 (auch unter PECAM-1 bekannt) wird von Endothelzellen exprimiert. Zur Darstellung des Gefäßendothels wurde ein PECAM-1 Antikörper (CD-31-PE, Ratte anti-Maus Clone MEC13.3, Biologend) in einem Verhältnis von 1:50 in kaltem PBS mit 1% BSA verdünnt und die Dottersäcke für 20 Minuten bei 4°C darin inkubiert. Zusätzlich

wurde mit Hilfe des für DNA spezifischen Farbstoffs Hoechst (Hoechst 33342, ThermoFisher) Zellkerne in einem Exzitations- und Emissionsspektrum von 361 bzw. 497 nm blau fluoreszierend kenntlich gemacht. Dafür wurden die Dottersäcke nach dem ersten Färbungsschritt in PBS gewaschen und für drei Minuten mit 1:2000 verdünntem Hoechst gefärbt. Nach nochmaligem Waschen wurden die Dottersäcke jeweils auf einen Objektträger übertragen, mit einem Deckglas abgedeckt und unter einem Fluoreszenzmikroskop (Axio Imager.M2, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen) Aufnahmen erstellt.

6. Statistische Auswertung

Sämtliche Daten wurden mit der GraphPad Prism 7 Software (GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA) analysiert und ausgewertet. Zur Optimierung der graphischen Darstellung wurde Adobe Illustrator CS6 (Adobe Systems Incorporated, San Jose, USA) verwendet.

Mittelwerte wurden als arithmetisches Mittel dargestellt. Als Maß für die Streuung ist bei Bedarf die einfache Standardabweichung mittels Fehlerbalken dargestellt. Die Normalverteilung wurde mittels D'Agostino-Pearson Test überprüft. Anschließend wurden folgende statistische Methoden zur Signifikanzermittlung durchgeführt: Gruppenvergleiche wurden bei Normalverteilung beider Gruppen mittels zweiseitigem T-Test für nicht-gepaarte Stichproben durchgeführt. Bei einer kleinen Fallzahl, wie es in Abbildung 18 im Hinblick auf die rollenden Makrophagen und Abbildung 22D der Fall war, wurde auf den Mann-Whitney-U Test zurückgegriffen. Dieser testet die Unterschiedlichkeit der zentralen Tendenzen von zwei unabhängigen Stichproben und stellt die nichtparametrische Version des T-Tests dar.

Eine statistische Signifikanz wurde bei einem p-Wert $\leq 0,05$ angenommen. Im Folgenden sind die Einzelwerte in tabellarischer Form zu den entsprechenden Abbildungen aufgeführt.

Abbildung 11B:

Erhebung der Einzelwerte	Es wurde ein repräsentatives mikroskopisches Feld von 400 μm x 400 μm pro embryonaler Dottersack ausgewertet. Pro Wurf wurden 1-7 Dottersäcke gezählt.
--------------------------	--

Anzahl der Einzelwerte	E8.5: 2, E9.5: 2, E10.5: 19*, E11.5: 5, E12.5: 13*, E16.5: 28* (*Hauptanalysezeitpunkt)
Anzahl der Würfe	E8.5: 2, E9.5: 2, E10.5: 6, E11.5: 2, E12.5: 4, E16.5: 6
Prozessierung der Werte	Die Einzelwerte der einzelnen Würfe wurden zu einer Gesamtgruppe zusammengefasst.
Test auf Normalverteilung (D'Agostino & Pearson)	E10.5 positiv ($p=0,6153$), E16.5 positiv ($p=0,0778$)
Test auf Signifikanz (ungepaarter T-Test)	E10.5 vs. E16.5: $p<0,0001$ (***)
Aufstellung der Einzelwerte zur statistischen Analyse	
E10.5	13; 11; 32; 21; 17; 19; 29; 20; 45; 41; 37; 38; 21; 33; 23; 25; 25; 31; 19
E16.5	122; 80; 100; 88; 87; 83; 88; 89; 81; 84; 100; 114; 104; 120; 93; 80; 100; 84; 90; 110; 80; 100; 92; 91; 80; 85; 82; 126

Abbildung 13C:

Erhebung der Einzelwerte	Es wurde ein repräsentatives mikroskopisches Feld von 400 μm x 400 μm pro embryonaler Region ausgewertet. Pro Wurf wurden 1-6 Embryonen ausgezählt. Bei sehr inhomogener Verteilung innerhalb einer Region oder schlechter Bildqualität erfolgte keine Auswertung des Embryos bzw. der jeweiligen Region.
Anzahl der Einzelwerte	E10.5 - Kopf: 19, Rumpf: 13, Schwanz: 15; E12.5 - Kopf: 5, Rumpf: 5, Schwanz: 5; E16.5 - Kopf: 10, Rumpf: 10, Schwanz: 10
Anzahl der Würfe	E10.5: 6, E12.5: 3, E16.5: 4
Prozessierung der Werte	Die Einzelwerte der einzelnen Würfe wurden zu einer Gesamtgruppe zusammengefasst.
Test auf Normalverteilung (D'Agostino & Pearson)	E10.5 positiv – Kopf: $p=0,1928$, Rumpf: $p=0,4756$, Schwanz: $p=0,6779$
Test auf Signifikanz (ungepaarter T-Test)	E10.5 Kopf vs. Rumpf: $p=0,0096$ (**), Kopf vs. Schwanz: $p=0,0093$ (**)
Aufstellung der Einzelwerte zur statistischen Analyse	
E10.5 Kopf	18; 23; 33; 55; 58; 55; 27; 59; 63; 67; 61; 75; 68; 8; 11; 63; 54; 67; 72
E10.5 Rumpf	9; 18; 15; 18; 28; 35; 41; 33; 42; 34; 37; 43; 48
E10.5 Schwanz	13; 14; 17; 25; 24; 23; 42; 32; 36; 40; 54; 47; 30; 39; 42

Abbildung 16B:

Erhebung der Einzelwerte	Es wurden Cx3cr1+ fluoreszierende intravaskuläre Zellen pro Minute in einem Gefäß mittlerer Größe quantifiziert. Es wurde jeweils ein repräsentativer Messwert pro Embryo erhoben. Pro Wurf wurden 1-3 Embryonen ausgezählt.
Anzahl der Einzelwerte	E8.5: 6, E9.5: 13; E10.5: 13; E11.5: 4, E12.5: 15, E13.5: 7; E14.5: 3, E16.5: 15, E18.5: 2
Anzahl der Würfe	E8.5: 3, E9.5: 7; E10.5: 6; E11.5: 2, E12.5: 7, E13.5: 3, E14.5: 2, E16.5: 6, E18.5: 2
Prozessierung der Werte	Die Einzelwerte der einzelnen Würfe wurden zu einer Gesamtgruppe zusammengefasst.
Statistik	Deskriptiv (Mittelwert, Standardabweichung)
Einzelwerte zur Erstellung des Diagramms (deskriptive Statistik)	
E8.5	0; 0; 0; 0; 0; 0
E9.5	18; 33; 8,3; 15,6; 8; 6,3; 38; 19; 32; 37; 33,3; 18; 26
E10.5	10; 12; 20,8; 38; 21; 12; 42; 35; 61; 58; 23; 54; 31
E11.5	3; 4; 4; 8
E12.5	0; 1; 0; 0; 1,3; 1,7; 0,3; 0; 0; 0; 1; 0; 0; 0; 0
E13.5	1,3; 0,3; 0,3; 0; 0; 0; 0,7
E14.5	0; 0; 0
E16.5	0; 0; 0; 0; 0; 0; 0; 0; 0; 0; 0; 0; 0; 0; 0
E18.5	0; 0

Abbildung 18:

Erhebung der Einzelwerte	Es wurde je ein Embryo pro Wurf detailliert analysiert; gezählt und quantifiziert (Geschwindigkeit in $\mu\text{m/s}$) wurden nur klar abgrenzbare Zellen (5-18 frei treibende bzw. 1-2 rollende Zellen pro Embryo).
Anzahl der Einzelwerte	Frei treibend: 50, rollend: 5
Anzahl der Würfe	4
Prozessierung der Werte	Die Einzelwerte der einzelnen Würfe wurden zu einer Gesamtgruppe zusammengefasst.
Test auf Normalverteilung (D'Agostino & Pearson)	negativ
Test auf Signifikanz (Mann-Whitney)	Frei treibend vs. rollend: $p < 0,0001$ (***)
Aufstellung der Einzelwerte zur statistischen Analyse	
Frei treibend	100; 150; 187,5; 181,3; 181,3; 81,3; 179,2; 183,3; 100; 140,6; 156,3; 190; 166,7; 125; 125; 128,6; 125; 100; 125; 141,7; 93,8; 125; 105,7; 275; 325;

	391,7; 412,5; 300; 187,5; 250; 230; 200; 187,5; 183,3; 187,5; 160; 150; 130; 125; 130; 400; 360; 400; 360; 450; 340; 340; 200; 300; 400
Rollend	14,1; 8,8; 22,5; 14,3; 62,5

Abbildung 21B:

Erhebung der Einzelwerte	Es wurde ein repräsentatives mikroskopisches Feld von 400 µm x 400 µm pro Dottersack und embry-onaler Region ausgewertet. Pro Wurf wurden 2 Embryonen ausgezählt.
Anzahl der Einzelwerte	Dottersack: 4, Kopf: 4, Rumpf: 4, Schwanz: 4
Anzahl der Würfe	2
Prozessierung der Werte	Die Einzelwerte der einzelnen Würfe wurden zu einer Gesamtgruppe zusammengefasst.
Test auf Normalverteilung (D'Agostino & Pearson)	negativ (zu kleine Fallzahl)
Test auf Signifikanz (Mann-Whitney)	Dottersack: ns, Kopf: ns, Rumpf: ns, Schwanz ns (Myb+/+ vs. Myb -/-); ns = nicht signifikant
Aufstellung der Einzelwerte zur statistischen Analyse	
Dottersack Myb +/+	29; 31; 33; 34
Kopf Myb +/+	21; 24; 25; 23
Rumpf Myb +/+	20; 22; 21; 23
Schwanz Myb +/+	20; 22; 23; 18
Dottersack Myb -/-	27; 31; 38; 32
Kopf Myb -/-	20; 19; 22; 19
Rumpf Myb -/-	19; 21; 20; 24
Schwanz Myb -/-	18; 17; 18; 20

Abbildung 21C:

Erhebung der Einzelwerte	Es wurden Cx3cr1+ fluoreszierende intravaskuläre Zellen pro Minute in einem Gefäß mittlerer Größe quantifiziert. Es wurde jeweils ein repräsentativer Messwert pro Embryo erhoben. Pro Wurf wurden 2 Embryonen ausgezählt.
Anzahl der Einzelwerte	Dottersack: 4, Kopf: 4, Rumpf: 4, Schwanz: 4
Anzahl der Würfe	2
Prozessierung der Werte	Die Einzelwerte der einzelnen Würfe wurden zu einer Gesamtgruppe zusammengefasst.
Test auf Normalverteilung (D'Agostino & Pearson)	negativ (zu kleine Fallzahl)
Test auf Signifikanz (Mann-Whitney)	nicht signifikant

Aufstellung der Einzelwerte zur statistischen Analyse	
Myb +/-	2,7; 2,5; 1,5; 9
Myb -/-	1; 2; 1; 6,3

Abbildung 22C:

Erhebung der Einzelwerte	Es wurde ein repräsentatives mikroskopisches Feld von 400 µm x 400 µm pro embryonaler Dottersack ausgewertet. Pro Wurf wurden 3-7 Dottersäcke ausgezählt.
Anzahl der Einzelwerte	E9.5: 10, E12.5: 25
Anzahl der Würfe	E9.5: 3, E12.5: 4
Prozessierung der Werte	Die Einzelwerte der einzelnen Würfe wurden zu einer Gesamtgruppe zusammengefasst.
Test auf Normalverteilung (D'Agostino & Pearson)	E9.5 positiv (p=0,3807), E12.5 positiv (p=0,6026)
Test auf Signifikanz (ungepaarter T-Test)	E9.5 vs. E12.5: p<0,0001 (***)
Aufstellung der Einzelwerte zur statistischen Analyse	
E9.5	12; 10; 14; 17; 13; 23; 40; 24; 36; 44
E12.5	96; 84; 136; 104; 130; 147; 131; 107; 115; 110; 152; 130; 126; 132; 128; 132; 142; 156; 100; 148; 99; 151; 123; 120; 112

Abbildung 22D:

Erhebung der Einzelwerte	Es wurden Csflr+ fluoreszierende intravaskuläre Zellen pro Minute in einem Gefäß mittlerer Größe quantifiziert. Es wurde jeweils ein repräsentativer Messwert pro Embryo erhoben. Pro Wurf wurden 2-5 Embryonen ausgezählt.
Anzahl der Einzelwerte	E9.5: 5, E12.5: 9
Anzahl der Würfe	E9.5: 2, E12.5: 2
Prozessierung der Werte	Die Einzelwerte der einzelnen Würfe wurden zu einer Gesamtgruppe zusammengefasst.
Test auf Normalverteilung (D'Agostino & Pearson)	negativ
Test auf Signifikanz (Mann-Whitney)	E9.5 vs. E12.5: p=0,001 (**)
Aufstellung der Einzelwerte zur statistischen Analyse	
E9.5	21; 33; 27; 25; 40
E12.5	14; 19,3; 12; 20; 18,7; 12,3; 14,7; 12,7; 13,3

Abbildung 23B:

Erhebung der Einzelwerte	Es wurde ein repräsentatives mikroskopisches Feld von 400 µm x 400 µm pro embryonaler Region ausgewertet. Pro Wurf wurden 2-8 Embryonen ausgezählt. Bei sehr inhomogener Verteilung innerhalb einer Region oder schlechter Bildqualität erfolgte keine Auswertung des Embryos bzw. der jeweiligen Region.
Anzahl der Einzelwerte	E9.5 - Kopf: 8, Rumpf: 9, Schwanz: 8; E12.5 - Kopf: 20, Rumpf: 17, Schwanz: 25
Anzahl der Würfe	E9.5: 3, E12.5: 5
Prozessierung der Werte	Die Einzelwerte der einzelnen Würfe wurden zu einer Gesamtgruppe zusammengefasst.
Test auf Normalverteilung (D'Agostino & Pearson)	E9.5 negativ, E12.5 positiv (Kopf $p=0,6551$, Rumpf $p=0,7998$, Schwanz $p=0,1998$)
Test auf Signifikanz (Mann-Whitney)	E9.5 vs. E12.5 – Kopf: $p<0,0001$ (***), Rumpf: $p<0,0001$ (***), Schwanz: $p<0,0001$ (***)
Aufstellung der Einzelwerte zur statistischen Analyse	
E9.5 Kopf	26; 27; 28; 56; 55; 30; 55; 53
E9.5 Rumpf	14; 11; 13; 15; 17; 20; 30; 48; 27
E9.5 Schwanz	28; 20; 16; 9; 5; 8; 4; 10
E12.5 Kopf	78; 93; 60; 67; 97; 78; 88; 72; 70; 73; 106; 78; 73; 78; 100; 71; 72; 74; 81; 50
E12.5 Rumpf	112; 100; 77; 94; 84; 99; 96; 100; 92; 86; 92; 68; 62; 64; 80; 84; 88
E12.5 Schwanz	136; 90; 142; 150; 118; 152; 154; 124; 86; 88; 96; 120; 86; 118; 80; 120; 80; 100; 84; 80; 86; 106; 122; 108; 94

V. ERGEBNISSE

Es ist seit einigen Jahren bekannt, dass gewebsständige Makrophagen in den meisten Organen einen dualen Ursprung haben – das Knochenmark und den extraembryonalen Dottersack. Die Tatsache, dass es bis heute keine eindeutigen Marker gibt, diese beiden Populationen zu unterscheiden, hat nicht nur die Entdeckung des dualen Ursprungs viele Jahre verzögert, sondern erschwert auch eine detaillierte Analyse dieser Makrophagen. Es ist daher unabdingbar ein erweitertes Verständnis über Makrophagen aus dem Dottersack und ihre Entwicklung sowie Migration zu gewinnen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit ist es erstmals gelungen, Makrophagen aus dem Dottersack *in vivo* fluoreszenzmikroskopisch zu visualisieren. Dabei konnten Makrophagen direkt, sowohl im Dottersack als auch im Embryo, nachgewiesen werden. Ziel der Arbeit war die Entstehung, die Proliferation und die Migration von Dottersackmakrophagen von ihrem Ursprungsort bis zum Embryo zu charakterisieren.

1. *In vivo* Epifluoreszenzmikroskopie zur Analyse der frühen Makrophagenentwicklung im *Cx3cr1*-GFP Modell

Zur frühen Analyse der Makrophagenentwicklung im murinen Dottersack wurden Makrophagen fluoreszenzmikroskopisch visualisiert.

Hierzu wurde ein Mausmodell mit einem GFP-gekoppelten Fraktalkin-Rezeptor, *Cx3cr1*, verwendet, der typischerweise auf gewebsständigen Makrophagen und zirkulierenden Monozyten exprimiert wird. Auf diese Weise konnten Dottersackmakrophagen früh visualisiert und ihr Entwicklungsprozess nachvollzogen werden. Es wurden Aufnahmen des Dottersacks sowie verschiedener embryonaler Regionen im Zeitraum von E8.5 bis E16.5 aufgezeichnet und damit die entscheidende Entwicklungsphase von Makrophagen im Dottersack erfasst (Abbildung 10).

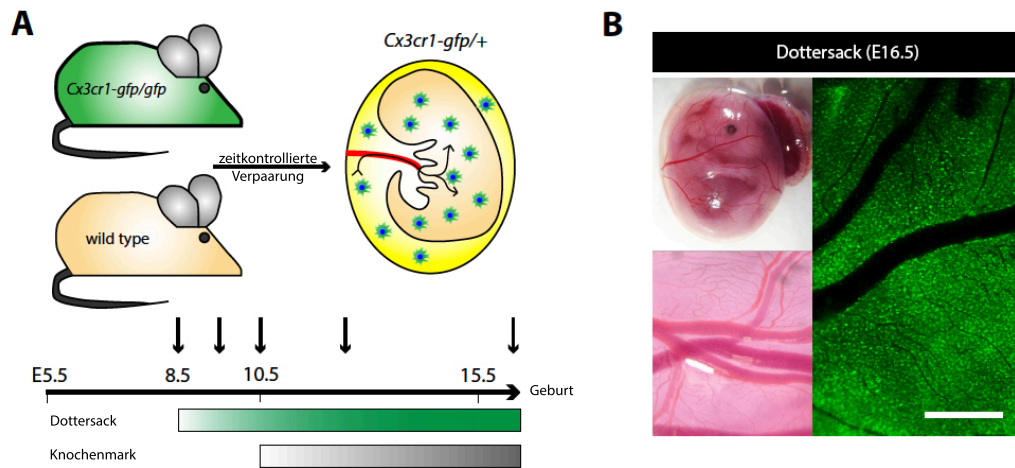


Abbildung 10 Das *Cx3cr1*-GFP Modell zur Visualisierung von Makrophagen im Dottersack

(A) Schemazeichnung zur Verpaarungsstrategie im *Cx3cr1*-GFP Modell mit Zeitleiste und markierten Analysezeitpunkten (Pfeile). (B) Mikroskopische Visualisierung eines murinen Dottersacks mittels Auflichtmikroskopie (linke Abbildungen) und mittels Fluoreszenzmikroskopie im *Cx3cr1*-GFP Modell (rechts). Skala 1000 μm .

2. Proliferation und morphologische Entwicklung von Dottersackmakrophagen im *Cx3cr1*-GFP Modell

Im ersten Abschnitt dieser Arbeit wurde zunächst auf statische Daten aus fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen fokussiert, bevor in einem zweiten Abschnitt dynamische Prozesse, insbesondere in Bezug auf die Migration von Makrophagen untersucht wurden.

An Tag 8.5 (E8.5) der murinen Embryonalentwicklung sind noch keine eindeutigen GFP-positiven Makrophagen nachzuweisen. Innerhalb der nächsten Stunden entsteht ein deutliches GFP-Signal in einzelnen rundlichen Zellen, die zu dem Zeitpunkt E9.5 mit einer Zelldichte von etwa 20 Zellen/ 400 μm x 400 μm nachzuweisen sind. Parallel zur voranschreitenden Embryogenese nimmt die Zahl der Makrophagen im Dottersack rapide zu, bis sie an Tag E12.5 ein Maximum von etwa 100 Zellen/ 400 μm x 400 μm erreicht.

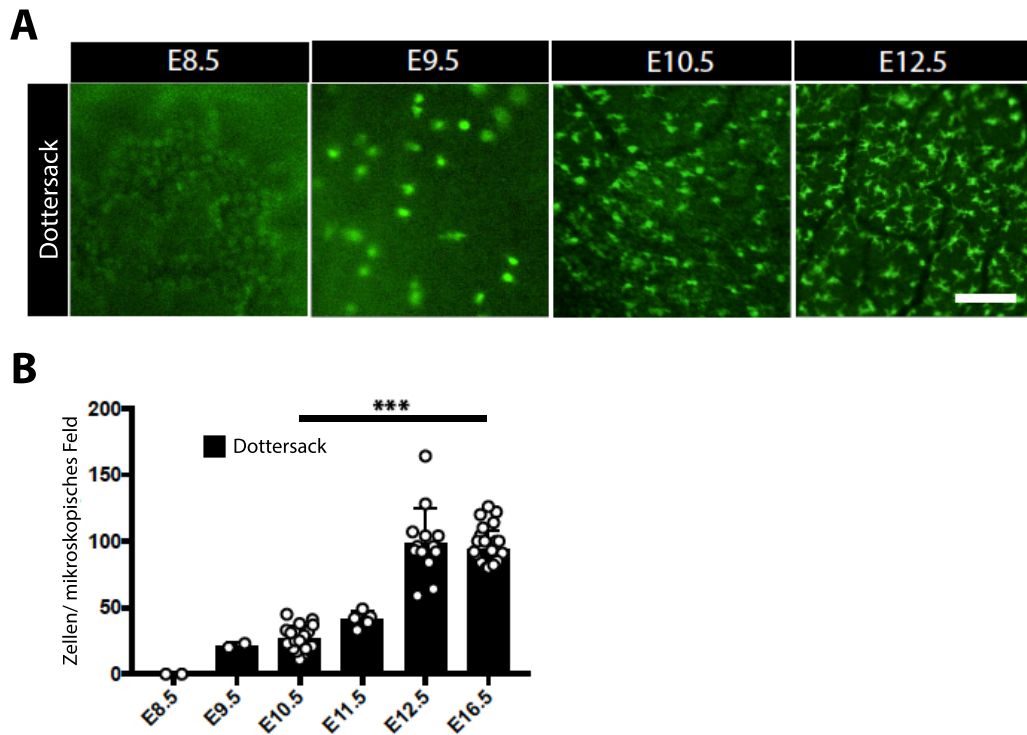


Abbildung 11 Entwicklung Cx3cr1-GFP positiver Makrophagen im Dottersack

(A) Fluoreszenzmikroskopische Bilder des Dottersacks aus Cx3cr1-GFP positiven Embryonen zu verschiedenen Zeitpunkten der Embryonalentwicklung. (B) Quantifizierung der Zelldichte pro mikroskopisches Bild von 400 μm x 400 μm . ***= $p < 0,0001$. Skala 100 μm (A).

Neben der reinen Steigerung der Zellzahl ist in diesem Rahmen auch eine Änderung der Zellmorphologie zu beobachten, die durch eine zunehmende Ausbildung von dendritischen Zellausläufern gekennzeichnet ist – eine Morphologie wie man sie typischerweise von adulten Makrophagen kennt. Ihre klassische finale Morphologie erreichen diese Makrophagen etwa am Tag E16.5 der embryonalen Entwicklung (Abbildung 12).

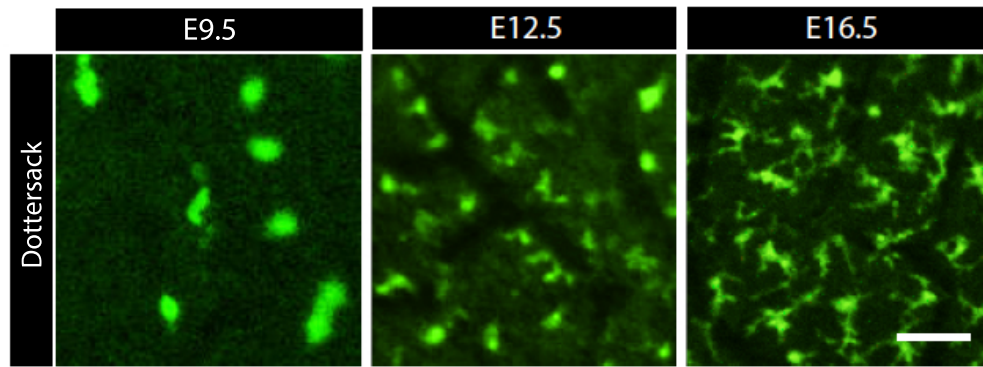


Abbildung 12 Morphologie von Dottersackmakrophagen

Dottersackmakrophagen erscheinen am Tag E9.5 mit einer sphärischen Morphologie und bilden im Laufe der embryonalen Entwicklung zunehmend Dendriten. Skala 50 μm .

Wenige Stunden nach dem ersten Erscheinen von Makrophagen im Dottersack sind erste Cx3cr1-GFP positive Zellen bereits auch im Embryo nachzuweisen.

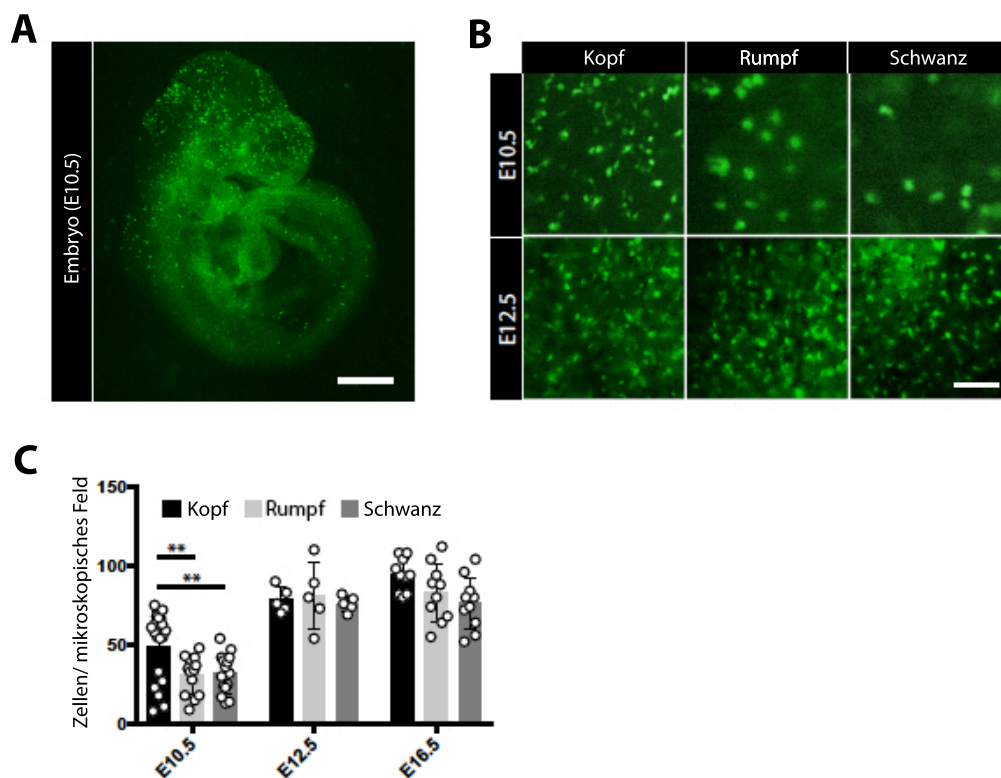


Abbildung 13 Cx3cr1-GFP exprimierende Dottersackmakrophagen im Embryo

(A) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines Embryos an Tag E10.5. Skala 1 mm. (B, C) Visualisierung (B) und Quantifizierung (C) der Zelldichte Cx3cr1-GFP positiver Makrophagen in verschiedenen embryonalen Regionen. **= $p < 0,01$. Skala 100 μm .

Diese Zellen sind bis etwa Tag 10 der embryonalen Entwicklung in der Kopfregion signifikant erhöht zu finden als in Rumpf oder Schwanz und verteilen sich im Verlauf der weiteren Entwicklung gleichmäßig auf die drei verschiedenen embryonalen Regionen. Analog zur beobachteten Änderung der Morphologie im Dottersack bilden sich zeitgleich auch im Embryo zunehmende Ausläufer der Makrophagen (Abbildung 13).

3. Zelluläre Charakterisierung Cx3cr1-GFP positiver Makrophagen

Um sicherzustellen, dass es sich bei den beobachteten GFP-positiven Zellen tatsächlich um Makrophagen handelt, wurden diese Zellen durchflusszytometrisch untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass diese Zellen neben Cx3cr1-GFP auch CD45, CD11b und F4/80 exprimieren und somit klar einer Makrophagenpopulation zuzuordnen sind. Insgesamt zeigte sich die Cx3cr1-GFP positive Population sehr homogen, sodass sich kein Hinweis auf weitere Zellen innerhalb der Cx3cr1-GFP positiven Population ergab (Abbildung 14).

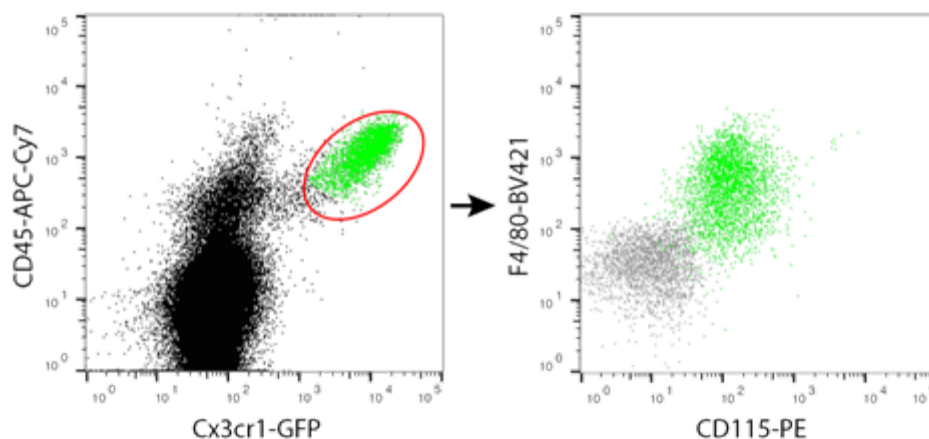


Abbildung 14 FACS Charakterisierung von Cx3cr1-GFP positiven Zellen

CD45 und Cx3cr1-GFP positive Zellen (grün) aus der Gesamtpopulation (komplettes Dottersackgewebe als Einzelzellsuspension) im linken Bild. Anschließend erfolgte eine Darstellung der F4/80 und CD115 (Csf1r) Expression. Hier zeigen sich Cx3cr1-GFP positive Zellen für beide Makrophagenmarker positiv. In grau ist im rechten Bild die Isotypkontrolle dargestellt.

4. Dottersackmakrophagen infiltrieren den Embryo über das Gefäßsystem

Parallel zur Entstehung von Makrophagen im Dottersack entwickelt sich etwa zur gleichen Zeit ein zunehmend dichter verzweigtes Gefäßnetzwerk im Dottersack (Abbildung 15A). Interessanterweise findet man zahlreiche GFP-positive Zellen in enger Assoziation mit diesen Gefäßen (Abbildung 15B). Ähnliche Beobachtungen finden sich bereits in vorangehenden Studien – ein direkter Beweis für eine Einwanderung ins Gefäßsystem konnte jedoch bisher nicht gezeigt werden. Mittels dynamischer Intravitalmikroskopie wurde daher diese Fragestellung im folgenden Abschnitt gezielt adressiert.

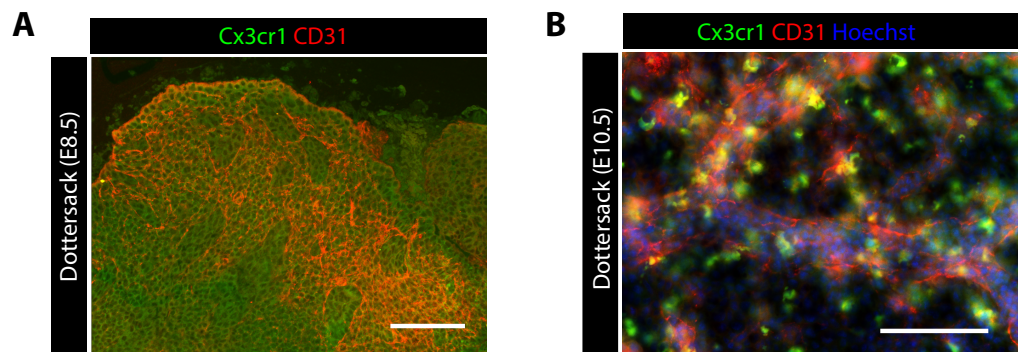


Abbildung 15 Gefäßentwicklung im murinen Dottersack

(A) Beginnende Formation von Gefäßanlagen am Tag E8.5 im embryonalen Dottersack. (B) Enge Assoziation von Cx3cr1-GFP positiven Makrophagen mit Gefäßen im Dottersack an Tag E10.5. Skala 100 µm.

Unmittelbar nach der Ausbildung erster Gefäße lassen sich Dottersackmakrophagen nicht nur in unmittelbarer Nähe zum Gefäßsystem nachweisen, sondern können auch direkt im Blutstrom visualisiert werden (Abbildung 16A). Während der weiteren embryonalen Entwicklung nimmt die Anzahl an Makrophagen im Blutstrom zunächst deutlich zu und erreicht etwa um Tag E10.5 ihr Maximum mit zirka 30 GFP-positiven Zellen pro Minute in einem Gefäß durchschnittlicher Größe. Darauf folgend kommt es zu einem drastischen Abfall der Zellen im Gefäß bis Tag E12.5, wobei zu noch späteren Zeitpunkten keine GFP-positiven Zellen mehr im Blutstrom nachweisbar sind (Abbildung 16B).

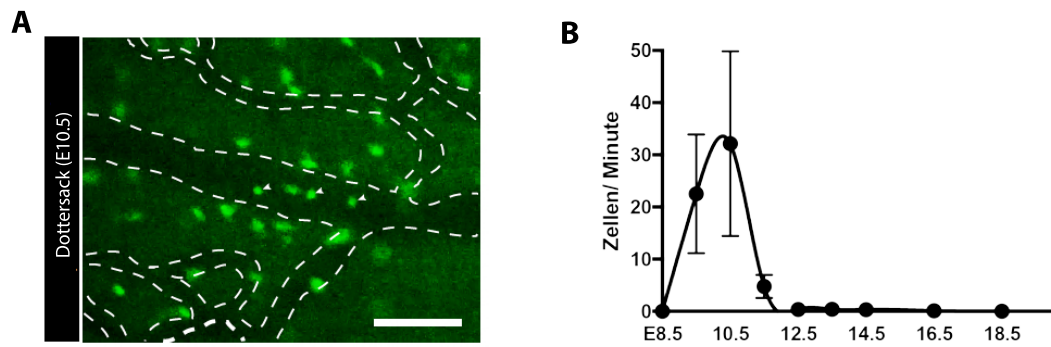


Abbildung 16 Intravaskuläre Dottersackmakrophagen

A) Intravitale Fluoreszenzmikroskopie mit Nachweis von intravaskulären Cx3cr1-positiven Makrophagen (Pfeilspitzen) an Tag E10.5 im Dottersack. (B) Quantifizierung intravaskulärer Zellen pro Minuten in einem Dottersackgefäß von durchschnittlicher Größe. Skala 100 μm .

Entscheidende Vorgänge im Rahmen der intravaskulären Migration von Makrophagen, wie die Einwanderung ins Gefäß, ein Rollen entlang des Endothels und die Auswanderung in Zielgewebe konnten im Rahmen dieser Arbeit intravital-mikroskopisch erfasst werden (Abbildung 17).

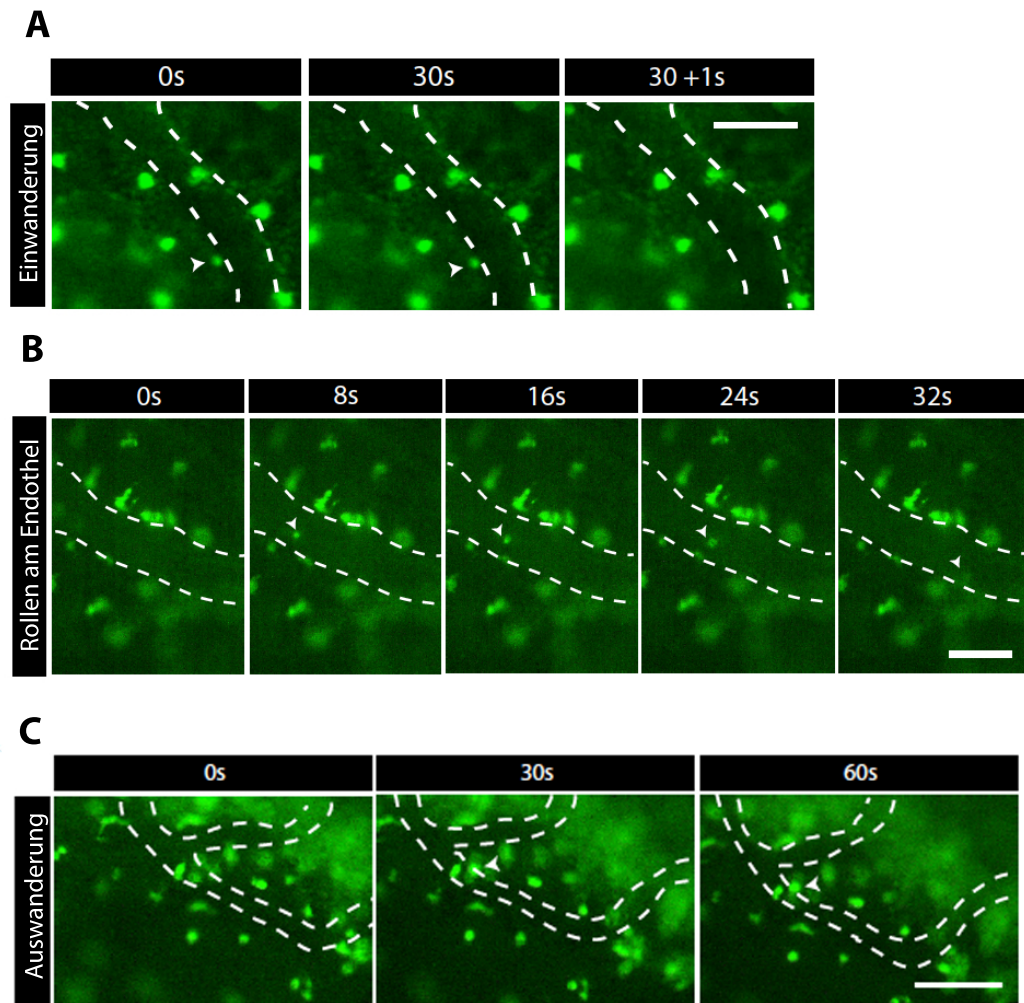


Abbildung 17 Migrationsvorgänge um das embryonale Gefäßsystem

(A-C) Bildsequenzen aus Videoaufnahmen von Cx3cr1-positiven Makrophagen, die im Dottersack in das Gefäßsystem einwandern (A) und es im embryonalen Zielgewebe verlassen (C). Gelegentlich lässt sich eine verlangsamte Bewegung der Zellen im Gefäß beobachten, was ein Rollen entlang des Endothels entspricht (B). Skala 100 μm .

Die durchschnittliche intravaskuläre Geschwindigkeit der Zellen betrug 210 $\mu\text{m/s}$. Wie bereits vorangehend erwähnt, wurden zeitweise Makrophagen beobachtet, die am Endothel entlang rollten. Dieser Vorgang führte zu einer deutlichen Reduktion der intravaskulären Bewegungsgeschwindigkeit auf etwa 25 $\mu\text{m/s}$ und es folgte gehäuft – jedoch nicht immer – eine Auswanderung aus dem Gefäßsystem (Abbildung 18).

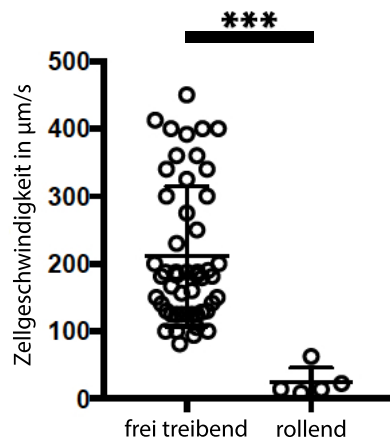


Abbildung 18 Zellgeschwindigkeit von Makrophagen im Gefäß

Abgebildet ist die Zellgeschwindigkeit von Cx3cr1-GFP positiven Makrophagen in einem Dottersackgefäß von durchschnittlicher Größe. ***= $p < 0,0001$.

5. Morphologie bestimmt das Migrationsverhalten von Dottersackmakrophagen

Das enge Zeitfenster von intravaskulär nachweisbaren Dottersackmakrophagen geht mit einer deutlichen Änderung der Zellmorphologie einher, wie vorangehend beschrieben (Abbildung 12). Interessanterweise wurden im Gefäßsystem ausschließlich Zellen mit sphärischer Form beobachtet, während Zellen mit vermehrter Dendritenbildung immobil imponierten. Um dieses Morphologie-abhängige Verhalten näher zu untersuchen, wurde in diesem Fall die epifluoreszenzmikroskopische Untersuchung durch eine hochauflösende konfokale Spinning-Disk Mikroskopie ergänzt. Auf diese Weise konnte unter Verwendung von *Cx3cr1^{Cre} Rosa26^{mT/mG}* Embryonen die beobachteten Effekte detailliert rekapituliert und gezeigt werden, dass primär sphärische Zellen mit dem Blutstrom treiben, während Makrophagen mit ausgiebiger Dendritenbildung weitgehend immobil paravaskulär zu finden waren (Abbildung 19). Diese paravaskulären Makrophagen zeichneten sich durch lokale Bewegungen ihrer Dendriten aus, mit denen sie möglicherweise mit der Umgebung interagieren.

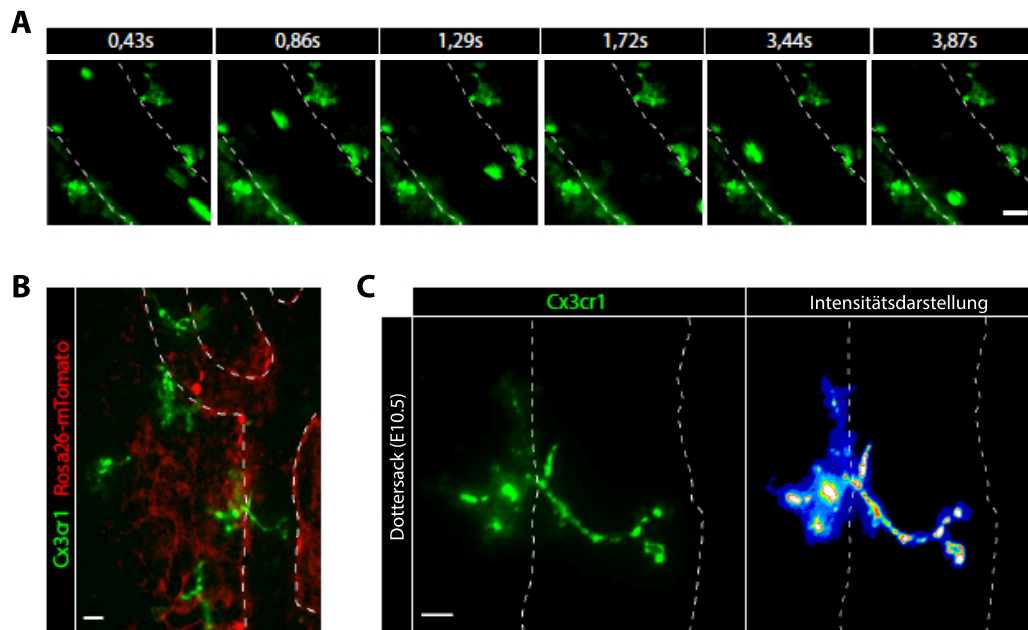


Abbildung 19 Spinning-Disk Konfokalmikroskopie von intravaskulären Cx3cr1-positiven Makrophagen

(A-C) Bildsequenzen aus einer intravitalen Videoaufnahme mit einem konfokalen Spinning-Disk Mikroskop. Abgebildet sind Dottersackgefäße am Tag E10.5 der embryonalen Entwicklung. Während intravaskuläre Zellen eine sphärische Morphologie aufweisen (A), haben paravaskuläre Makrophagen bereits typische dendritische Ausläufer gebildet (A-C). Vergrößerung 20x, Skala 20 μm (A, B), Vergrößerung 63x, Intensitätsdarstellung mit LUT „16 colors“ Fiji, Skala 10 μm (C).

6. Isolierte Analyse der Entwicklung von Dottersackmakrophagen im *Myb*-Knockout Modell

Mit dem Einsetzen der definitiven Hämatopoese ab etwa Tag 12 der embryonalen Entwicklung, kann der Ursprung der Makrophagen im Cx3cr1-GFP Modell nicht mehr eindeutig identifiziert werden. Um diese Problematik für spätere Phasen der Embryonalentwicklung zu überwinden, wurde ein ergänzender Mausstamm eingekreuzt, in dem die definitive Hämatopoese nicht vorhanden ist – das *Myb*-Knockout (*Myb*^{-/-}) Modell. Charakteristisch für diese Mäuse ist ein vollständiges Ausbleiben der definitiven Hämatopoese, sodass diese Mäuse etwa um den Tag 16-17 der embryonalen Entwicklung an einer schweren Anämie versterben. Um eine frühe embryonale Analyse bis Tag E16.5 zu ermöglichen, wurden daher heterozygote *Myb*^{+/-} Mäuse miteinander verpaart, die zusätzlich durch einen Cx3cr1-GFP Fluoreszenzmarker gekennzeichnet waren - *Cx3cr1*^{gfp/gfp} *Myb*^{+/-} x *Cx3cr1*^{+/+} *Myb*^{+/-} (Abbildung 20).

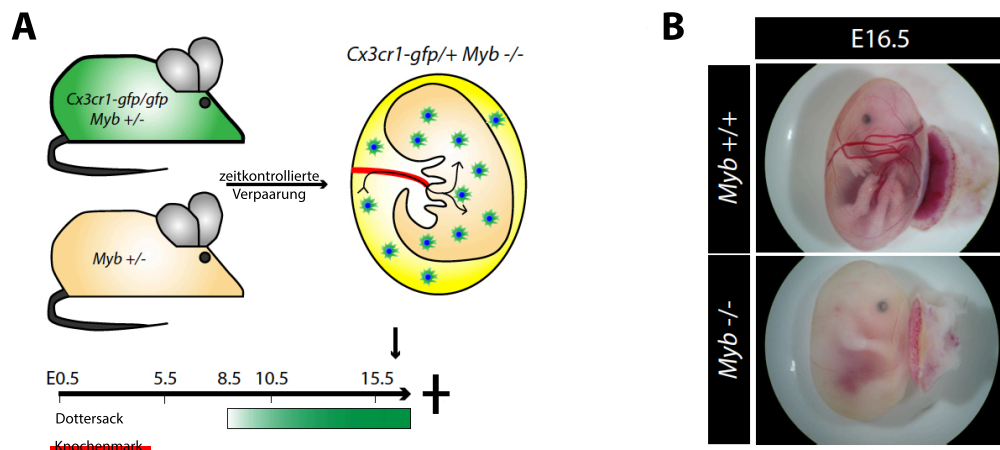


Abbildung 20 Inhibition der definitiven Hämatopoese im Myb-Knockout Modell

(A) Schematische Darstellung der Verpaarungsstrategie mit Zeitachse und Analysezeitpunkt (Pfeil). (B) Auflichtmikroskopie von Embryonen am Tag E16.5.

Analysiert wurden die Zelldichte von $Cx3cr1$ -positiven Zellen sowohl im Dottersack als auch im Embryo, sowie das Migrationsverhalten in Dottersackgefäßen in Myb -Nullmutanten ($Cx3cr1^{gfp/+} Myb^{-/-}$) gegenüber Wildtyp-Wurfgeschwistern ($Cx3cr1^{gfp/+} Myb^{+/+}$). Wie bereits vorangehend erwähnt wurde dieses Modell primär zur Analyse späterer Entwicklungszeitpunkte, das heißt nach dem Einsetzen der definitiven Hämatopoese, genutzt. Die Zellzahlen $Cx3cr1$ -positiver Zellen im Dottersack und im Embryo waren zum Zeitpunkt E16.5 zwischen Nullmutanten und Wildtyp Geschwistern vergleichbar. Ebenfalls zeigte sich kein deutlicher Unterschied bezüglich des Nachweises intravaskulär migrierender Zellen (Abbildung 21).

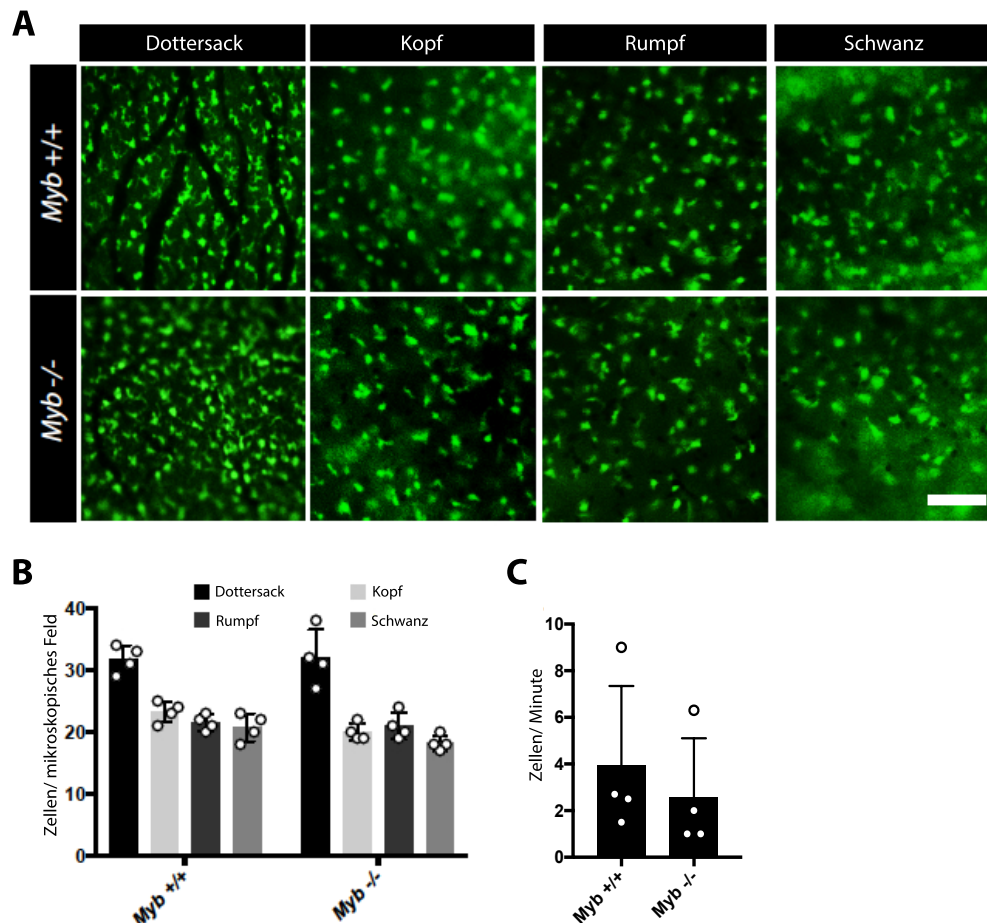


Abbildung 21 Charakterisierung von Dottersackmakrophagen im *Myb*-Knockout Modell

(A, B) Fluoreszenzaufnahmen vom Dottersack und verschiedenen embryonalen Regionen in *Cx3cr1*-GFP positiven Mäusen, Wildtyp und *Myb*-Knockout, (A) mit zugehöriger Quantifizierung (B). (C) Analyse intravaskulärer *Cx3cr1*-positiver Zellen zum Zeitpunkt E16.5 in Wildtyp- und *Myb*-Knockout Mäusen. Skala 100 μ m.

7. Entwicklung von erythro-myeloiden Progenitorzellen und frühen Makrophagen im *Csf1r*-Modell

Dottersackmakrophagen entwickeln sich aus erythro-myeloiden Progenitorzellen (EMPs) im embryonalen Dottersack [35, 150]. Diese frühen Vorläuferzellen entstehen ab etwa Tag E8 der embryonalen Entwicklung und somit zeitlich leicht vor dem ersten Nachweis von ersten *Cx3cr1*-GFP positiven Zellen, da *Cx3cr1* erst mit beginnender Differenzierung zu Makrophagen exprimiert wird [128]. Um dennoch eine vollständige Analyse der Makrophagenentwicklung im murinen Dottersack zu gewährleisten, wurde ein ergänzendes Mausmodell verwendet, welches

durch eine *Csf1r*-abhängige Fluoreszenz gekennzeichnet ist. Im Gegensatz zu *Cx3cr1* wird *Csf1r* bereits auf EMPs exprimiert und somit zeitlich etwas früher als *Cx3cr1* (Abbildung 4)[128].

In einem ersten Ansatz wurde ein konstitutives *Csf1r*-Modell verwendet, indem *Csf1r*-Cre Mäuse mit einem *Rosa26*-YFP Fluoreszenzreportertier verpaart wurden. Die analysierten Embryonen zeigten ein sehr vergleichbares Proliferations-, Differenzierungs- und Migrationsverhalten wie vorangehend für das *Cx3cr1*-Modell beschrieben. Hier konnte auch erneut gezeigt werden, dass erste Vorläuferzellen etwa am Tag E9 der Embryonalentwicklung fluoreszenzmikroskopisch sichtbar werden. Diese *Csf1r*-positiven Zellen proliferieren rasch und zeigen eine zunehmende Dendritenbildung in der frühen Entwicklungsphase. Analog zum *Cx3cr1*-Modell, lässt sich auch für *Csf1r*-positive Makrophagen eine streng limitierte intravaskuläre Einwanderungsperiode zwischen etwa E10.5 und E12.5 identifizieren. Die generell leicht erhöhten Zellzahlen sind auf die Tatsache zurückzuführen, dass im *Csf1r*-Modell als Marker für EMPs neben Makrophagen auch eine gewisse Menge an anderen Vorläuferzellen markiert werden (Erythrozytenvorläufer, neutrophile Granulozyten und Monozyten), die temporär ebenfalls fluoreszenzmikroskopisch nachweisbar sind (Abbildung 22 und Abbildung 23).

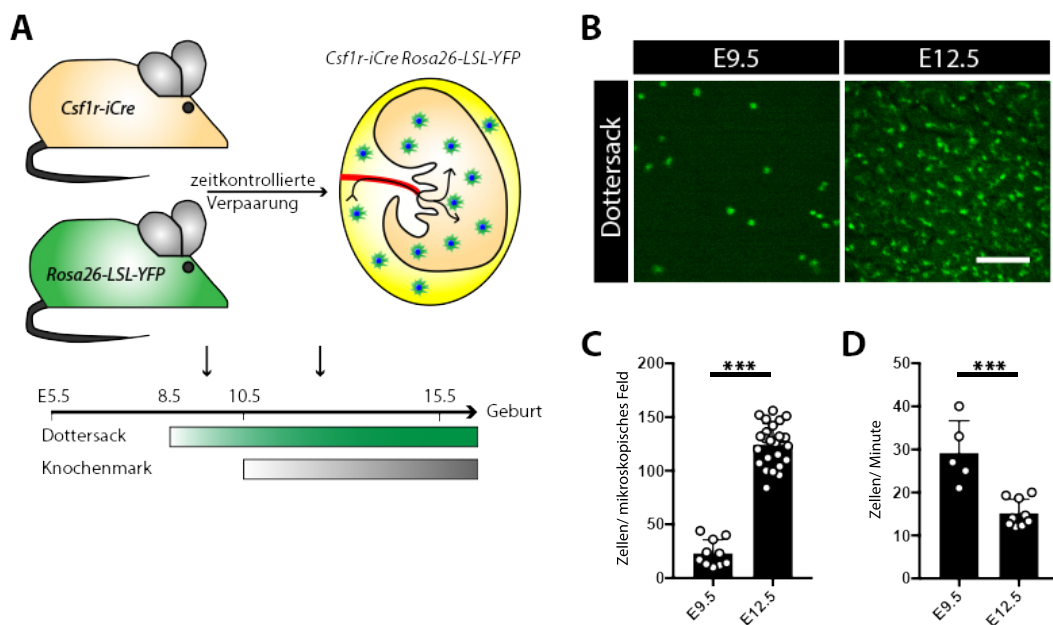


Abbildung 22 Entwicklung von Makrophagen im *Csf1r*-Modell im Dottersack

(A) Schematische Darstellung zur Verpaarungsstrategie im *Csf1r*-Mausmodell mit Markierung der Analysezeitpunkte auf der Zeitleiste (Pfeile). (B, C) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Entwicklung von Makrophagen im Dottersack (B) sowie die zugehörige Quantifizierung (C) ***= $p < 0,0001$. (D) Quantifizierung intravaskulärer Zellen in Dottersackgefäßen von durchschnittlicher Größe im *Csf1r*-Modell. ***= $p < 0,001$. Skala 100 µm.

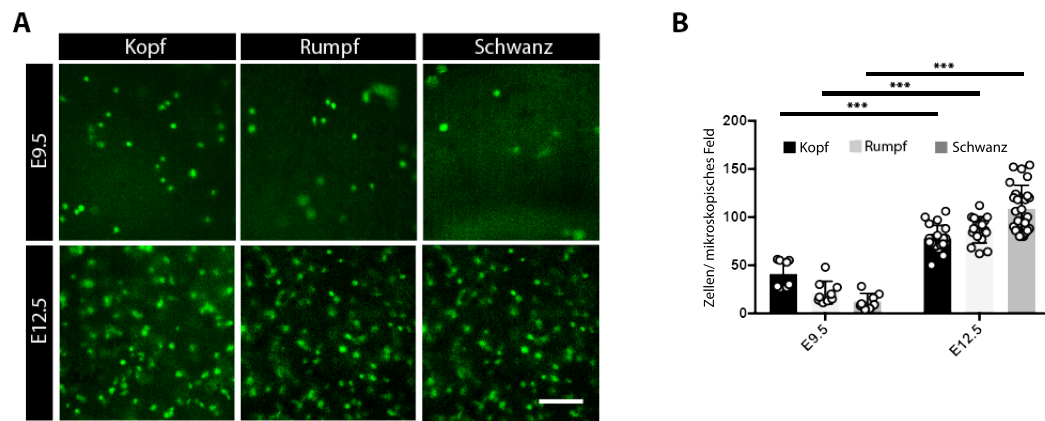


Abbildung 23 Csflr-positive Zellen im Mausembryo

(A) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Csflr-positiven Zellen im Mausembryo in verschiedenen Regionen an Tag E9.5 und E12.5 (A) mit zugehöriger Quantifizierung (B). ***= $p < 0,0001$. Skala 100 μm .

8. Klonale Expansion von Dottersackmakrophagen im *pulse-labeling* Modell

Alternativ zu einer Unterdrückung der definitiven Hämatopoese durch ein *Myb*-Knockout Modell besteht die Möglichkeit Makrophagen zu einem gezielten Zeitpunkt der Embryonalentwicklung fluoreszierend zu markieren und ihre Entwicklung im weiteren Verlauf nachzuverfolgen. Wählt man als Markierungszeitpunkt, einen Zeitpunkt vor Entstehung der definitiven Hämatopoese, können auf diese Weise Makrophagen aus dem Dottersack selektiv markiert werden – eine sogenannte *pulse-labeling* Strategie (Abbildung 24).

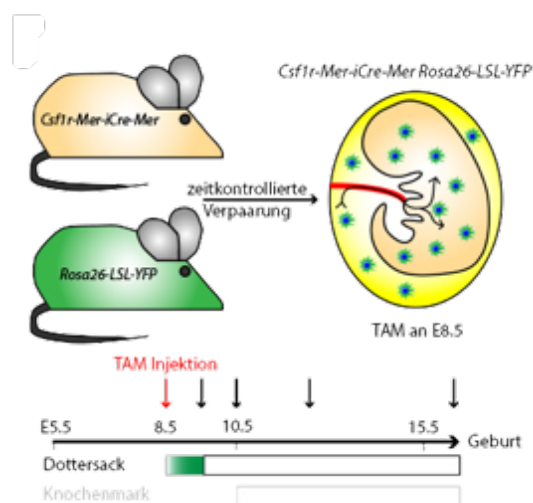


Abbildung 24 Csflr-pulse-labeling-Modell

Abgebildet ist eine schematische Darstellung des *pulse-labeling*-Modells in *Csflr-Mer-iCre-Mer* Mäusen. Nach Tamoxifen Injektion (roter Pfeil) wird eine Cre-Rekombinase in *Csflr*-positiven Zellen exprimiert. Diese führt wiederum zur Expression des Fluoreszenzreporters YFP. Die Analysezeitpunkte sind auf der Zeitachse markiert (schwarze Pfeile).

Basierend auf dieser Methodik konnte im *Csf1r*-Modell die Entwicklung der Dottersackmakrophagen - auch nach dem Einsetzen der definitiven Hämatopoese der fetalen Leber und des Knochenmarks- gezielt untersucht werden. Wiederum konnten die vorangehend erhobenen Beobachtungen rekapituliert werden (Abbildung 25). Ergänzend ließ sich durch die punktuelle zeitliche Markierung in der frühen Embryonalentwicklung, ein klonales Expansionsverhalten dieser Zellen nachweisen. Während im Dottersack fluoreszierende Zellgruppen bis zu über 20 Zellen an Tag E12.5 nachweisbar waren, zeigten sich im Embryo etwas kleinere Zellgruppen von 2-7 Zellen (Abbildung 25).

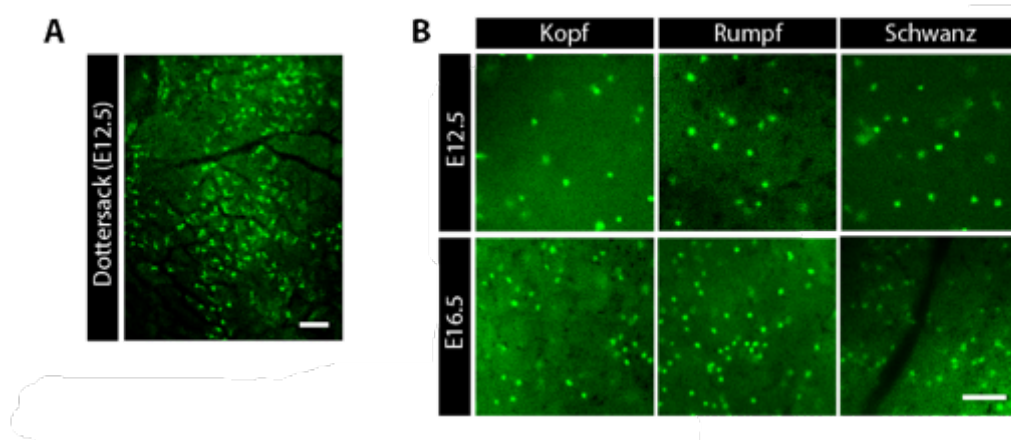


Abbildung 25 Klonale Expansion von *pulse-gelabelten Csf1r*-positiven EMPs

(A) Fluoreszenzaufnahme *pulse-gelabelter Csf1r*-positiver Zellen im embryonalen Dottersack an Tag E12.5. (B) Visualisierung von *pulse-gelabelten Csf1r*-positiven Zellen in verschiedenen embryonalen Regionen an Tag E12.5 und E16.5. Skala 100 µm.

VI. DISKUSSION

Der duale Ursprung von Makrophagen, zum einen aus dem embryonalen Dottersack und zum anderen aus dem Knochenmark, ist erst seit wenigen Jahren bekannt. Während Makrophagen aus dem Knochenmark detailliert charakterisiert sind, sind grundlegende Mechanismen der Entstehung, Entwicklung und Migration von Makrophagen aus dem Dottersack noch weitgehend uncharakterisiert.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit ist es erstmals gelungen, Dottersackmakrophagen intravital mittels Epifluoreszenzmikroskopie zu visualisieren. Auf diese Weise konnten relevante Daten zur Entstehung, Proliferation, Differenzierung und Migration dieser frühen Makrophagenpopulation zum einen bestätigt und zum anderen neue Erkenntnisse gewonnen werden.

Makrophagen entwickeln sich im embryonalen Dottersack aus erythro-myeloiden Progenitorzellen (EMPs), die etwa ab Tag E8.5 der Embryonalentwicklung nachweisbar sind [10, 11]. Neben den myeloiden Zellen und Erythrozyten entwickeln sich diese frühen hämatopoetischen Zellen überwiegend zu Prämakrophagen, die durch die Expression von Cx3cr1 gekennzeichnet sind [128].

Ab Tag E9.5 sind erste Prämakrophagen fluoreszenzmikroskopisch im Dottersack nachweisbar. Diese Zellen sind durch eine sphärische Form charakterisiert und zeigen eine hohe Proliferationsrate. Die Population zeigt eine rasche, signifikante Zunahme von einzelnen Zellen zu einem dicht mit Makrophagen besiedelten Dottersack und weist eine maximale Zelldichte von ca. 100 Zellen pro mikroskopischem Feld (400 μm x 400 μm) ab etwa Tag E12.5 auf. Mit voranschreitender Entwicklung des Embryos bilden diese Prämakrophagen im Rahmen des Differenzierungsprozesses eine zunehmende Anzahl an dendritischen Fortsätzen mit denen sie mutmaßlich mit der lokalen Umgebung interagieren. Diese Vermutung resultiert auf einer wiederholten Beobachtung von Mikrobewegungen dieser Fortsätze, die ein Abtasten der Umgebung suggerieren [151].

Unmittelbar nach dem ersten Erscheinen von Makrophagen im Dottersack sind die Zellen auch im embryonalen Organismus vorzufinden. Interessanterweise besiedeln sie um Tag E9.5 zunächst hauptsächlich die embryonale Kopfregion und sind hier im Vergleich zu den übrigen Regionen in einer signifikant höheren Anzahl vorzufinden bevor es wenig später zu einer gleichmäßigen Verteilung der

Zellen im gesamten Embryo kommt. Es ist bereits aus vorangehenden Studien bekannt, dass die Mikrogliazellen (Makrophagen) des Gehirns ausschließlich aus Dottersackmakrophagen rekrutiert werden [10, 43, 56, 152]. Ihr frühes Erscheinen in dieser Region deutet auf die wichtige physiologische Bedeutung dieser Region in der frühen Embryonalphase hin, in der Makrophagen wichtige Entwicklungs- und Umbauvorgänge steuern [77].

Es konnte gezeigt werden, dass die erste Entstehung von EMPs und Prämakrophagen unmittelbar mit der Bildung von frühen vaskulären Strukturen korreliert. Zudem wurde nachgewiesen, dass Makrophagen im Dottersack eine enge Assoziation zum dortigen Gefäßnetzwerk haben. Diese Beobachtung und die Tatsache, dass zwischen dem ersten Erscheinen von Makrophagen im Dottersack und im Embryo nur eine sehr kurze Zeitspanne liegt, suggeriert, dass Makrophagen über das Gefäßsystem in den Embryo einwandern. Vorangehende Studien haben diesbezüglich kontroverse Ergebnisse geliefert, sodass mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie gezielt diese Fragestellung adressiert wurde: Es wurde direkt nachgewiesen, wie Makrophagen in das Gefäßsystem einwandern und in embryonalen Zielgeweben das Gefäßsystem wieder verlassen haben [78, 153-155]. Zudem wurden in der intravaskulären Phase wiederholt Ereignisse beobachtet, bei denen Makrophagen entlang des Endothels gerollt sind. Es kam nach dem Rollen sowohl zu passageren Adhäsionsprozessen – im Dottersack und im Embryo – als auch zu einer dauerhaften Auswanderung aus dem Gefäßsystem.

Bemerkenswerterweise sind die beobachteten Migrationsvorgänge, insbesondere der Nachweis von intravaskulären Makrophagen, eng mit der Morphologie der Makrophagen assoziiert. Während der frühen Phasen mit sphärischen Makrophagen im Dottersack, etwa E9.5 bis E11.5, sind zahlreiche intravaskuläre Dottersackmakrophagen nachzuweisen. Sie erreichen im Gefäßsystem eine maximale Häufigkeit von zirka 30 Zellen/ Minuten in einem Dottersackgefäß von durchschnittlicher Größe. Wenige Stunden bis Tage später ist ein signifikanter Rückgang der Zellen zu beobachten. Bereits ab Tag E12.5 sind kaum noch Zellen im Gefäßsystem nachzuweisen, bevor mit vollständiger Ausbildung der dendritischen Ausläufer am Tag E16.5 die Migration ins Gefäßsystem komplett sistiert. Diese Beobachtung konnte mittels hochauflösender intravitaler Spinning-Disk Konfokalmikroskopie nochmals nachvollzogen und somit weitergehend unterstützt werden.

Seitens der vaskulären Entwicklung des Dottersacks ist von der zunehmenden Blutflussgeschwindigkeit von keinem Einfluss auf die Zahl der migrierenden Makrophagen im Gefäß auszugehen. Ab dem Einsetzen der embryonalen Blutzirkulation ist eine starke Zunahme der Blutflussgeschwindigkeit in den Gefäßen des murinen Dottersacks bis E13.5 beschrieben. Zu diesem Zeitpunkt erreicht die bis dahin zunehmende Flussgeschwindigkeit ein Plateau [156]. Da die maximale Migrationsrate von Dottersackmakrophagen im Zeitraum E9.5-E10.5 liegt, scheint die Flussgeschwindigkeit die Migration der Makrophagen und ihren Vorläufern nicht wesentlich zu beeinflussen.

Da Cx3cr1 kein für Makrophagen spezifischer Marker ist und auch unter anderem von Monozyten exprimiert wird, wurde im *Myb* Modell überprüft, ob es sich in der intravitalmikroskopischen Analyse von GFP positiven Zellen im Cx3cr1-GFP Modell ausschließlich um Dottersackmakrophagen handelt [11, 74, 136]. Durch den Vergleich E16.5 alter Nullmutanten eines Wurfes mit heterozygoten Wurfgeschwistern konnte bestätigt werden, dass die analysierten Cx3cr1 positiven Zellen ausschließlich Dottersackmakrophagen darstellen und spezifisch für die Dottersackhämatopoese sind. Die Zellzahlen pro Fläche waren zwischen den Wurfgeschwistern vergleichbar. Um Tag 12.5 setzt die definitive Hämatopoese in der fetalen Leber ein. Ebenso sistiert die Migration der Dottersackmakrophagen im Gefäßsystem des Dottersacks um Tag E12.5. Aus diesem Zusammenhang stellte sich die Frage, ob die einsetzende definitive Hämatopoese Einfluss auf die zurückgehende intravasale Wanderung von Dottersackmakrophagen darstellt. *Cx3cr1^{+gfp} Myb^{-/-}* Embryonen zeigten hinsichtlich der Migrationsrate der Makrophagen jedoch ebenfalls vergleichbare Werte zu ihren heterozygoten Wurfgeschwistern. Daher ist anzunehmen, dass sistierende Migration der Zellen von anderen Faktoren als dem Beginn der Hämatopoese in der Leber beeinflusst wird.

Zudem wurde im Rahmen von *pulse-labeling* Versuchen gezeigt, dass EMPs bzw. Prämakrophagen in der frühen Entwicklungsphase stark proliferieren und ein klonales Teilungsverhalten aufweisen. Dieses Teilungsverhalten lässt sich in geringerer Ausprägung auch im Embryo beobachten. Es ist also anzunehmen, dass Dottersackmakrophagen in erster Linie im Dottersack stark proliferieren, dann über das Gefäßsystem in den Embryo einwandern und dort mit geringerer Teilungsrate weiter proliferieren, während sie zeitgleich unter zunehmender Dendritenbildung zu reifen Makrophagen differenzieren.

Da die hohe Proliferationsrate der Makrophagen im Dottersack zeitlich mit der Ausbildung embryonaler Blutgefäße korreliert, könnten Dottersackmakrophagen eine weitere Schutzbarriere nach der Plazenta darstellen [43, 157, 158]. Über die Blutzirkulation können potenzielle Pathogene, die die Plazenta passieren über den maternalen Blutfluss zum Embryo gelangen. Es wäre denkbar, dass Makrophagen hier den ersten angeborenen immunologischen Schutz des Embryos darstellen bevor sie Unterstützung von Immunzellen der definitiven Hämatopoese erhalten.

Zusammenfassend konnte durch intravitale Untersuchungen gezeigt werden, dass Makrophagen ab Tag 8-9 der embryonalen Entwicklung im Dottersack entstehen, dort rasch proliferieren und über das Gefäßsystem in embryonale Zielorgane auswandern. Dieser Vorgang wird maßgeblich durch die Zellmorphologie mitbestimmt: Sphärische Zellen wandern in einem engen Zeitfenster von zirka 2 Tagen um E10.5 herum in hoher Anzahl in das Gefäßsystem ein, während dieser Migrationsprozess mit fortschreitender Dendritenbildung komplett sistiert. Diese Beobachtung konnte unter Verwendung verschiedener Makrophagenmarker (Cx3cr1, Csf1r), sowie durch verschiedene Techniken der Identifikation von Makrophagen aus dem Dottersack (zeitkontrollierte Untersuchung, *Myb*-Knockout Modell, *pulse-labeling* Strategie) in unterschiedlichen Versuchsansätzen bestätigt werden.

Molekulare Mechanismen die die Entwicklung, Proliferation, Migration und Differenzierung von Dottersackmakrophagen steuern sind bisher unbekannt und müssen in zukünftigen Studien adressiert werden. Zudem gilt es zu klären inwiefern sich Makrophagen aus dem Dottersack von Makrophagen aus dem Knochenmark unterscheiden. Der Entstehungsort im embryonalen Dottersack, die räumliche Nähe zur Plazenta und damit dem maternalen Gewebe, legen funktionell einen frühen Abwehrmechanismus gegen maternale Infektionserreger nahe – zu einem Zeitpunkt, bevor das definitive Immunsystem des Embryos entwickelt ist. Auch diese Fragestellung der funktionellen Bedeutung einer frühen Hämatopoese im Dottersack gilt es zukünftig näher zu beleuchten.

VII. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden Dottersackmakrophagen erstmalig *in vivo* mittels Epifluoreszenzmikroskopie dargestellt und verfolgt. Es konnte die Theorie bestätigt werden, dass die Migration der Makrophagen aus dem Dottersack zu embryonalem Gewebe über das Gefäßsystem erfolgt. Zusätzlich wurden weitere kinetische Eigenschaften dieser Zellen beschrieben.

Die Migration im Gefäß und die Besiedelung des Embryos durch die Makrophagen und ihren Vorläuferzellen ist auf ein sehr enges Zeitfenster von zwei Tagen begrenzt und erfolgt in der murinen Trächtigkeit zwischen Tag E9.5 bis maximal Tag E12.5.

Durch die intravitale Visualisierung der Makrophagen wurde in dieser Studie gezeigt, dass das Migrationsverhalten der Zellen mit ihrer Morphologie korreliert. Während ausschließlich runde Zellen in den frühen Zeitpunkten um E9.0 - 10.5 im Gefäßsystem vorzufinden sind, ändert sich ihre morphologische Erscheinung im weiteren Verlauf der embryonalen und fetalen Entwicklung zu einer dendritischen Form wie sie für differenzierte, adulte Makrophagen charakteristisch ist.

Durch zeitlich punktuelle, genetische Markierung von Makrophagenvorläuferzellen, wurde ihnen außerdem im Dottersack, als auch im embryonalen Gewebe ein klonales Expansionsverhalten nachgewiesen.

Die gewonnenen Daten liefern eine Basis für das Verständnis über die Entstehung und Verbreitung von Dottersackmakrophagen. Weitere Studien sind nötig um diese Zellpopulation weiter zu charakterisieren, sowie ihre Funktionen in Abgrenzung zu Knochenmarksmakrophagen genauer zu spezifizieren.

VIII. SUMMARY

This thesis elucidates the early proliferation and migration kinetics of yolk sac-derived macrophages in the murine yolk sac. For the first time, macrophages were traced and imaged *in vivo* using an intravital microscopy setup and fate mapping analyses. Our observations confirm the theory that yolk sac-derived macrophages migrate to the embryo proper via the bloodstream.

The migration within the vasculature of the yolk sac as well as the colonialization of the embryo is restricted to a narrow time window of approximately two days and finds its peak between day E9.5 and E10.5.

The visualization of the cells *in vivo* demonstrated a correlation between the morphological shape of the cells and their migration behavior within the vessels. While spherical shaped cells are found within the early days of development between E9.5 - E10.5 in the vasculature, macrophages with typical dendrites remained in the tissue after day E12.5.

We were able to visualize macrophage progenitor cells by a pulse labeling strategy before the onset of definitive hematopoiesis. Pre-macrophages showed a clonal expansion pattern in the yolk sac as well as in embryonic tissues.

The collected data give first insights in the development, proliferation and migration of yolk sac-derived, tissue resident macrophages. Further targeted studies on this macrophage population are required to specify their functions compared to bone marrow-derived macrophages.

IX. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

4-OHT	(Z)-4-Hydroxytamoxifen
AG	Antigen
AGM	Aorta, Gonaden und Mesonephros
AK	Antikörper
AMV	Aviäres Myeloblastosis Virus
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
CCD	Charged Coupled Device
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	Komplementär DNA
Csflr	Colony Stimulating factor-1 receptor
C _T -Wert	Cycle Threshold; PCR-Zyklus bei dem das fluoreszierende Signal erstmals Schwellenwert erreicht
DC	Dendritische Zelle (dendritic cell)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EMP	Erythromyeloide Progenitorzelle
F1	Erste filiale Generation; Tochtergeneration der ersten Parentalgeneneration
FACS	Fluorescent Activated Cell Sorting
FSc	Forward Scatter
G	Gauge, Feinheit des Außendurchmessers einer Kanüle
GFP	Green fluorescent protein
HSC	Hämatopoetische Stammzellen
IFN- γ	Interferon- γ
IGF-1	Insulin-like Growth Factor-1
IL	Interleukin
IVM	Intravitalmikroskopie
ko	Knockout
LPS	Lipopolysaccharid
Mer	Murine estrogen receptor

MPS	mononukleäres Phagozytensystem
mut	Mutante
nm	Nanometer
NK	Natürliche Killerzelle
PAMP	Pathogen-Associated Molecular Pattern
PBS	Phosphat buffered saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration der Wasserstoffionen
PMT	Photomultiplier
PRR	Pattern Recognition Receptors
PTPRC	Protein Tyrosine Phosphatase, Receptor-type C
qPCR	Quantitative Polymerase Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
s	Sekunde
SCF	Stem Cell Factor
SSc	Side Scatter
TLR	Toll-Like Receptor
TGF	Transforming Growth Factor
U	Unit, Enzymeinheit
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
Vol.	Volumen
wt	Wildtyp
YFP	Yellow fluorescend protein
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer

X. TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1	Verwendete Antikörper bei der Durchflusszytometrie	32
-----------	--	----

XI. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1	Schematische Darstellung der Komponenten des angeborenen Immunsystems	3
Abbildung 2	Dualer Ursprung gewebsständiger Makrophagen aus dem Dottersack und der definitiven Hämatopoese	7
Abbildung 3	Zeitlichen Entstehung der Knochenmarks- und Dottersackhämatopoese in der Maus	10
Abbildung 4	Entwicklungsstufen von Dottersackmakrophagen mit entsprechenden Oberflächenmarkern	16
Abbildung 5	Schematischer Erbgang aus Verpaarungen von Myb ^{+/-} Elterntieren	20
Abbildung 6	4-OHT Injektion vor dem Einsetzen der definitiven Hämatopoese an Tag E8.5	21
Abbildung 7	Score Sheet für den Versuchsabschnitt Tamoxifengabe in trächtigen Mäusen	24
Abbildung 8	Epifluoreszenzmikroskop	28
Abbildung 9	Genotypisierung eines E12.5 Wurfes von Cx3cr1 Myb ^{+/-} Elterntieren	30
Abbildung 10	Das Cx3cr1-GFP Modell zur Visualisierung von Makrophagen im Dottersack	41
Abbildung 11	Entwicklung Cx3cr1-GFP positiver Makrophagen im Dottersack	42
Abbildung 12	Morphologie von Dottersackmakrophagen	43
Abbildung 13	Cx3cr1-GFP exprimierende Dottersackmakrophagen im Embryo	43
Abbildung 14	FACS Charakterisierung von Cx3cr1-GFP positiven Zellen	44
Abbildung 15	Gefäßentwicklung im murinen Dottersack	45
Abbildung 16	Intravaskuläre Dottersackmakrophagen	46
Abbildung 17	Migrationsvorgänge um das embryonale Gefäßsystem	47
Abbildung 18	Spinning-Disk Konfokalmikroskopie von intravaskulären Cx3cr1-positiven Makrophagen	49
Abbildung 20	Inhibition der definitiven Hämatopoese im Myb-Knockout Modell	50

Abbildung 21	Charakterisierung von Dottersackmakrophagen im Myb-Knockout Modell	51
Abbildung 22	Entwicklung von Makrophagen im Csf1r-Modell im Dottersack	52
Abbildung 23	Csf1r-positive Zellen im Mausembryo	53
Abbildung 24	Csf1r-pulse-labeling-Modell	53
Abbildung 25	Klonale Expansion von pulse-gelabelten Csf1r-positiven EMPs	54

XII. LITERATURVERZEICHNIS

1. Naito, M., Macrophage differentiation and function in health and disease. *Pathol Int*, 2008. **58**(3): p. 143-55.
2. Gordon, S., Innate immune functions of macrophages in different tissue environments. *J Innate Immun*, 2012. **4**(5-6): p. 409-10.
3. Gordon, S. and L. Martinez-Pomares, Physiological roles of macrophages. *Pflügers Arch*, 2017.
4. Lech, M., et al., Tissues use resident dendritic cells and macrophages to maintain homeostasis and to regain homeostasis upon tissue injury: the immunoregulatory role of changing tissue environments. *Mediators Inflamm*, 2012. **2012**: p. 951390.
5. Wood, W., et al., Mesenchymal cells engulf and clear apoptotic footplate cells in macrophageless PU.1 null mouse embryos. *Development*, 2000. **127**(24): p. 5245-52.
6. Wu, R., et al., Pathophysiological mechanisms and therapeutic potentials of macrophages in non-alcoholic steatohepatitis. *Expert Opin Ther Targets*, 2016. **20**(5): p. 615-26.
7. Huang, C.K., et al., New therapy via targeting androgen receptor in monocytes/macrophages to battle atherosclerosis. *Hypertension*, 2014. **63**(6): p. 1345-53.
8. Fenyo, I.M. and A.V. Gafencu, The involvement of the monocytes/macrophages in chronic inflammation associated with atherosclerosis. *Immunobiology*, 2013. **218**(11): p. 1376-84.
9. Cumano, A. and I. Godin, Ontogeny of the hematopoietic system. *Annu Rev Immunol*, 2007. **25**: p. 745-85.
10. Bertrand, J.Y., et al., Three pathways to mature macrophages in the early mouse yolk sac. *Blood*, 2005. **106**(9): p. 3004-11.
11. Schulz, C., et al., A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. *Science*, 2012. **336**(6077): p. 86-90.
12. Yona, S., et al., Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. *Immunity*, 2013. **38**(1): p. 79-91.
13. Kanitakis, J., et al., Self-renewal capacity of human epidermal Langerhans cells: observations made on a composite tissue allograft. *Exp Dermatol*, 2011. **20**(2): p. 145-6.
14. Gordon, S., Elie Metchnikoff, the Man and the Myth. *J Innate Immun*, 2016. **8**(3): p. 223-7.

15. Gordon, S., Phagocytosis: An Immunobiologic Process. *Immunity*, 2016. **44**(3): p. 463-75.
16. Cooper, E.L., From Darwin and Metchnikoff to Burnet and beyond. *Contrib Microbiol*, 2008. **15**: p. 1-11.
17. Desjardins, M., M. Houde, and E. Gagnon, Phagocytosis: the convoluted way from nutrition to adaptive immunity. *Immunol Rev*, 2005. **207**: p. 158-65.
18. Buchmann, K., Evolution of Innate Immunity: Clues from Invertebrates via Fish to Mammals. *Front Immunol*, 2014. **5**: p. 459.
19. Ito, T., et al., Phagocytosis and hydrogen peroxide production by phagocytes of the sea urchin *Strongylocentrotus nudus*. *Dev Comp Immunol*, 1992. **16**(4): p. 287-94.
20. Sabella, C., et al., Cyclosporin A suspends transplantation reactions in the marine sponge *Microciona prolifera*. *J Immunol*, 2007. **179**(9): p. 5927-35.
21. Dr. Beck, G. and G.S. Dr. Habicht. Das Wirbeltier-Immunsystem: Vorformen bei Wirbellosen. 1997 15.03.17]; Available from: <http://www.spektrum.de/magazin/das-wirbeltier-immunsystem-vorformen-bei-wirbellosen/823585>.
22. Habicht, G.S., Primordial immunity: foundations for the vertebrate immune system. Introduction. *Ann N Y Acad Sci*, 1994. **712**: p. 367.
23. Murphy, K.P., Innate Immunity: The First Lines of Defense, in Janeway's Immunobiology. 2012, Garland Science: New York, USA. p. 37-73.
24. Murphy, K.P., Immunological memory, in Janeway's Immunobiology. 2012, Garland Science: New York, USA. p. 429-464.
25. De Smet, K. and R. Contreras, Human antimicrobial peptides: defensins, cathelicidins and histatins. *Biotechnol Lett*, 2005. **27**(18): p. 1337-47.
26. van Lookeren Campagne, M., C. Wiesmann, and E.J. Brown, Macrophage complement receptors and pathogen clearance. *Cell Microbiol*, 2007. **9**(9): p. 2095-102.
27. Zhou, L., et al., Macrophages polarization is mediated by the combination of PRR ligands and distinct inflammatory cytokines. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015. **8**(9): p. 10964-74.
28. Lee, C.F., et al., Fc and C3b receptor expression of phagocytes in poorly controlled diabetic patients. *Proc Natl Sci Counc Repub China B*, 1986. **10**(4): p. 236-44.
29. Aderem, A. and D.M. Underhill, Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol*, 1999. **17**: p. 593-623.
30. Selbitz, H.-J., U. Truyen, and P. Valentin-Weigand, Grundlagen der

- Infektionsimmunologie, in Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. 2011.
31. Lubbers, R., et al., Production of complement components by cells of the immune system. *Clin Exp Immunol*, 2017.
 32. Ricklin, D., et al., Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol*, 2010. **11**(9): p. 785-97.
 33. van Furth, R. and Z.A. Cohn, The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *J Exp Med*, 1968. **128**(3): p. 415-35.
 34. Alliot, F., I. Godin, and B. Pessac, Microglia derive from progenitors, originating from the yolk sac, and which proliferate in the brain. *Brain Res Dev Brain Res*, 1999. **117**(2): p. 145-52.
 35. Gomez Perdiguero, E., et al., Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors. *Nature*, 2015. **518**(7540): p. 547-51.
 36. Schnorr, B. and M. Kressin, Embryologie der Haustiere, in Embryologie der Haustiere. 2011, Enke Verlag: Stuttgart. p. 276.
 37. Parwaresch, M.R. and H.H. Wacker, Origin and kinetics of resident tissue macrophages. Parabiosis studies with radiolabelled leucocytes. *Cell Tissue Kinet*, 1984. **17**(1): p. 25-39.
 38. van Furth, R. and M.M. Diesselhoff-den Dulk, Dual origin of mouse spleen macrophages. *J Exp Med*, 1984. **160**(5): p. 1273-83.
 39. Geissmann, F., et al., Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science*, 2010. **327**(5966): p. 656-61.
 40. Hashimoto, D., et al., Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity*, 2013. **38**(4): p. 792-804.
 41. Merad, M., et al., Langerhans cells renew in the skin throughout life under steady-state conditions. *Nat Immunol*, 2002. **3**(12): p. 1135-41.
 42. Koushik, S.V., et al., Targeted inactivation of the sodium-calcium exchanger (Ncx1) results in the lack of a heartbeat and abnormal myofibrillar organization. *Faseb j*, 2001. **15**(7): p. 1209-11.
 43. Ginhoux, F., et al., Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science*, 2010. **330**(6005): p. 841-5.
 44. Hoeffel, G., et al., Adult Langerhans cells derive predominantly from embryonic fetal liver monocytes with a minor contribution of yolk sac-derived macrophages. *J Exp Med*, 2012. **209**(6): p. 1167-81.
 45. Ajami, B., et al., Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. *Nat Neurosci*, 2007. **10**(12): p. 1538-43.

46. Guillems, M., et al., Alveolar macrophages develop from fetal monocytes that differentiate into long-lived cells in the first week of life via GM-CSF. *J Exp Med*, 2013. **210**(10): p. 1977-92.
47. Bain, C.C., et al., Constant replenishment from circulating monocytes maintains the macrophage pool in the intestine of adult mice. *Nat Immunol*, 2014. **15**(10): p. 929-37.
48. Varol, C., et al., Monocytes give rise to mucosal, but not splenic, conventional dendritic cells. *J Exp Med*, 2007. **204**(1): p. 171-80.
49. Ginhoux, F., et al., Origin and differentiation of microglia. *Front Cell Neurosci*, 2013. **7**: p. 45.
50. Kierdorf, K., et al., Microglia emerge from erythromyeloid precursors via Pu.1- and Irf8-dependent pathways. *Nat Neurosci*, 2013. **16**(3): p. 273-80.
51. Chorro, L., et al., Langerhans cell (LC) proliferation mediates neonatal development, homeostasis, and inflammation-associated expansion of the epidermal LC network. *J Exp Med*, 2009. **206**(13): p. 3089-100.
52. Gold, K.S. and K. Bruckner, Macrophages and cellular immunity in *Drosophila melanogaster*. *Semin Immunol*, 2015. **27**(6): p. 357-68.
53. Gold, K.S. and K. Bruckner, *Drosophila* as a model for the two myeloid blood cell systems in vertebrates. *Exp Hematol*, 2014. **42**(8): p. 717-27.
54. Sieweke, M.H. and J.E. Allen, Beyond stem cells: self-renewal of differentiated macrophages. *Science*, 2013. **342**(6161): p. 1242974.
55. McGrath, K.E., J.M. Frame, and J. Palis, Early hematopoiesis and macrophage development. *Semin Immunol*, 2015. **27**(6): p. 379-87.
56. Palis, J., et al., Development of erythroid and myeloid progenitors in the yolk sac and embryo proper of the mouse. *Development*, 1999. **126**(22): p. 5073-84.
57. Boisset, J.C., et al., In vivo imaging of haematopoietic cells emerging from the mouse aortic endothelium. *Nature*, 2010. **464**(7285): p. 116-20.
58. Kissa, K. and P. Herbomel, Blood stem cells emerge from aortic endothelium by a novel type of cell transition. *Nature*, 2010. **464**(7285): p. 112-5.
59. Palis, J., Primitive and definitive erythropoiesis in mammals. *Front Physiol*, 2014. **5**: p. 3.
60. Isern, J., et al., Single-lineage transcriptome analysis reveals key regulatory pathways in primitive erythroid progenitors in the mouse embryo. *Blood*, 2011. **117**(18): p. 4924-34.
61. Kingsley, P.D., et al., "Maturation" globin switching in primary primitive erythroid cells. *Blood*, 2006. **107**(4): p. 1665-72.

62. Takahashi, K. and M. Naito, Development, differentiation, and proliferation of macrophages in the rat yolk sac. *Tissue Cell*, 1993. **25**(3): p. 351-62.
63. Palis, J., et al., Spatial and temporal emergence of high proliferative potential hematopoietic precursors during murine embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(8): p. 4528-33.
64. Orkin, S.H. and L.I. Zon, Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell*, 2008. **132**(4): p. 631-44.
65. Bertrand, J.Y., et al., Definitive hematopoiesis initiates through a committed erythromyeloid progenitor in the zebrafish embryo. *Development*, 2007. **134**(23): p. 4147-56.
66. Ginhoux, F. and S. Jung, Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. *Nat Rev Immunol*, 2014. **14**(6): p. 392-404.
67. Enzan, H., Electron microscopic studies of macrophages in early human yolk sacs. *Acta Pathol Jpn*, 1986. **36**(1): p. 49-64.
68. Migliaccio, G., et al., Human embryonic hemopoiesis. Kinetics of progenitors and precursors underlying the yolk sac----liver transition. *J Clin Invest*, 1986. **78**(1): p. 51-60.
69. Citro, G., et al., Inhibition of leukemia cell proliferation by receptor-mediated uptake of c-myb antisense oligodeoxynucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. **89**(15): p. 7031-5.
70. Gewirtz, A.M., et al., G1/S transition in normal human T-lymphocytes requires the nuclear protein encoded by c-myb. *Science*, 1989. **245**(4914): p. 180-3.
71. Nomura, N., et al., Isolation of human cDNA clones of myb-related genes, A-myb and B-myb. *Nucleic Acids Res*, 1988. **16**(23): p. 11075-89.
72. Klempnauer, K.H., T.J. Gonda, and J.M. Bishop, Nucleotide sequence of the retroviral leukemia gene v-myb and its cellular progenitor c-myb: the architecture of a transduced oncogene. *Cell*, 1982. **31**(2 Pt 1): p. 453-63.
73. Klempnauer, K.H., et al., The product of the retroviral transforming gene v-myb is a truncated version of the protein encoded by the cellular oncogene c-myb. *Cell*, 1983. **33**(2): p. 345-55.
74. Mucenski, M.L., et al., A functional c-myb gene is required for normal murine fetal hepatic hematopoiesis. *Cell*, 1991. **65**(4): p. 677-89.
75. Sumner, R., et al., Initiation of adult myelopoiesis can occur in the absence of c-Myb whereas subsequent development is strictly dependent on the transcription factor. *Oncogene*, 2000. **19**(30): p. 3335-42.
76. Nimmerjahn, A., F. Kirchhoff, and F. Helmchen, Resting microglial cells

- are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science*, 2005. **308**(5726): p. 1314-8.
77. Paolicelli, R.C., et al., Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science*, 2011. **333**(6048): p. 1456-8.
 78. Fantin, A., et al., Tissue macrophages act as cellular chaperones for vascular anastomosis downstream of VEGF-mediated endothelial tip cell induction. *Blood*, 2010. **116**(5): p. 829-40.
 79. Checchin, D., et al., Potential role of microglia in retinal blood vessel formation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2006. **47**(8): p. 3595-602.
 80. Sakurai, E., et al., Macrophage depletion inhibits experimental choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2003. **44**(8): p. 3578-85.
 81. Gerhardt, H., et al., VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J Cell Biol*, 2003. **161**(6): p. 1163-77.
 82. Willenborg, S., et al., CCR2 recruits an inflammatory macrophage subpopulation critical for angiogenesis in tissue repair. *Blood*, 2012. **120**(3): p. 613-25.
 83. Vannella, K.M. and T.A. Wynn, Mechanisms of Organ Injury and Repair by Macrophages. *Annu Rev Physiol*, 2017. **79**: p. 593-617.
 84. Sato, T.N., et al., Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation. *Nature*, 1995. **376**(6535): p. 70-4.
 85. Fantin, A., C.H. Maden, and C. Ruhrberg, Neuropilin ligands in vascular and neuronal patterning. *Biochem Soc Trans*, 2009. **37**(Pt 6): p. 1228-32.
 86. McKercher, S.R., et al., Targeted disruption of the PU.1 gene results in multiple hematopoietic abnormalities. *Embo j*, 1996. **15**(20): p. 5647-58.
 87. Wynn, T.A. and L. Barron, Macrophages: master regulators of inflammation and fibrosis. *Semin Liver Dis*, 2010. **30**(3): p. 245-57.
 88. Fallowfield, J.A., et al., Scar-associated macrophages are a major source of hepatic matrix metalloproteinase-13 and facilitate the resolution of murine hepatic fibrosis. *J Immunol*, 2007. **178**(8): p. 5288-95.
 89. Pellicoro, A., et al., Elastin accumulation is regulated at the level of degradation by macrophage metalloelastase (MMP-12) during experimental liver fibrosis. *Hepatology*, 2012. **55**(6): p. 1965-75.
 90. Wynn, T.A., A. Chawla, and J.W. Pollard, Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature*, 2013. **496**(7446): p. 445-55.
 91. Niida, S., et al., Vascular endothelial growth factor can substitute for macrophage colony-stimulating factor in the support of osteoclastic bone resorption. *J Exp Med*, 1999. **190**(2): p. 293-8.

92. Pollard, J.W., Trophic macrophages in development and disease. *Nat Rev Immunol*, 2009. **9**(4): p. 259-70.
93. Kim, K.H., S.M. Son, and I. Mook-Jung, Contributions of Microglia to Structural Synaptic Plasticity. *J Exp Neurosci*, 2013. **7**: p. 85-91.
94. Santos, E. and C.A. Noggle, Synaptic Pruning, in *Encyclopedia of Child Behavior and Development*, S. Goldstein and J.A. Naglieri, Editors. 2011, Springer US: Boston, MA. p. 1464-1465.
95. Parkhurst, C.N., et al., Microglia promote learning-dependent synapse formation through BDNF. *Cell*, 2013. **155**(7): p. 1596-609.
96. Solito, E. and M. Sastre, Microglia Function in Alzheimer's Disease. *Front Pharmacol*, 2012. **3**.
97. Lopategui Cabezas, I., A. Herrera Batista, and G. Penton Rol, The role of glial cells in Alzheimer disease: potential therapeutic implications. *Neurologia*, 2014. **29**(5): p. 305-9.
98. Dong, Q. and J.R. Wright, Degradation of surfactant protein D by alveolar macrophages. *Am J Physiol*, 1998. **274**(1 Pt 1): p. L97-105.
99. Forbes, A., et al., Alveolar macrophage depletion is associated with increased surfactant pool sizes in adult rats. *J Appl Physiol* (1985), 2007. **103**(2): p. 637-45.
100. Nguyen-Lefebvre, A.T. and A. Horuzsko, Kupffer Cell Metabolism and Function. *J Enzymol Metab*, 2015. **1**(1).
101. Terpstra, V. and T.J. van Berkel, Scavenger receptors on liver Kupffer cells mediate the in vivo uptake of oxidatively damaged red blood cells in mice. *Blood*, 2000. **95**(6): p. 2157-63.
102. Nguyen, K.D., et al., Alternatively activated macrophages produce catecholamines to sustain adaptive thermogenesis. *Nature*, 2011. **480**(7375): p. 104-8.
103. Kierdorf, K., et al., Development and function of tissue resident macrophages in mice. *Semin Immunol*, 2015. **27**(6): p. 369-78.
104. Murphy, K.P., The Induced Responses of Innate Immunity, in *Janeway's Immunobiology*. 2012, Garland Science: New York, USA. p. 75-125.
105. Larsson, B.M., et al., Gram positive bacteria induce IL-6 and IL-8 production in human alveolar macrophages and epithelial cells. *Inflammation*, 1999. **23**(3): p. 217-30.
106. Svanborg, C., G. Godaly, and M. Hedlund, Cytokine responses during mucosal infections: role in disease pathogenesis and host defence. *Curr Opin Microbiol*, 1999. **2**(1): p. 99-105.
107. Dalton, D.K., et al., Multiple defects of immune cell function in mice with

- disrupted interferon-gamma genes. *Science*, 1993. **259**(5102): p. 1739-42.
108. Murray, R.Z., et al., A role for the phagosome in cytokine secretion. *Science*, 2005. **310**(5753): p. 1492-5.
109. Stein, M., et al., Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J Exp Med*, 1992. **176**(1): p. 287-92.
110. Doyle, A.G., et al., Interleukin-13 alters the activation state of murine macrophages in vitro: comparison with interleukin-4 and interferon-gamma. *Eur J Immunol*, 1994. **24**(6): p. 1441-5.
111. Mosser, D.M., The many faces of macrophage activation. *J Leukoc Biol*, 2003. **73**(2): p. 209-12.
112. Davis, M.J., et al., Macrophage M1/M2 polarization dynamically adapts to changes in cytokine microenvironments in *Cryptococcus neoformans* infection. *MBio*, 2013. **4**(3): p. e00264-13.
113. Furlan, G., et al., Phosphatase CD45 both positively and negatively regulates T cell receptor phosphorylation in reconstituted membrane protein clusters. *J Biol Chem*, 2014. **289**(41): p. 28514-25.
114. Sanchez-Madrid, F., et al., Mapping of antigenic and functional epitopes on the alpha- and beta-subunits of two related mouse glycoproteins involved in cell interactions, LFA-1 and Mac-1. *J Exp Med*, 1983. **158**(2): p. 586-602.
115. Pan, W., et al., CR3 (CD11b/CD18) is the major macrophage receptor for IgM antibody-mediated phagocytosis of African trypanosomes: diverse effect on subsequent synthesis of tumor necrosis factor alpha and nitric oxide. *Microbes Infect*, 2006. **8**(5): p. 1209-18.
116. Murphy, K.P., Appendices II-IV, in *Janeway's Immunobiology*. 2012, Garland Science: New York, USA. p. 763-783.
117. Hynes, R.O., Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*, 2002. **110**(6): p. 673-87.
118. Sheppard, D., In vivo functions of integrins: lessons from null mutations in mice. *Matrix Biol*, 2000. **19**(3): p. 203-9.
119. Austyn, J.M. and S. Gordon, F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage. *Eur J Immunol*, 1981. **11**(10): p. 805-15.
120. Morris, L., C.F. Graham, and S. Gordon, Macrophages in haemopoietic and other tissues of the developing mouse detected by the monoclonal antibody F4/80. *Development*, 1991. **112**(2): p. 517-26.
121. Pierce, K.L., R.T. Premont, and R.J. Lefkowitz, Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002. **3**(9): p. 639-50.

122. Fernandez, E.J. and E. Lolis, Structure, function, and inhibition of chemokines. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2002. **42**: p. 469-99.
123. Bazan, J.F., et al., A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature*, 1997. **385**(6617): p. 640-4.
124. Pan, Y., et al., Neurotactin, a membrane-anchored chemokine upregulated in brain inflammation. *Nature*, 1997. **387**(6633): p. 611-7.
125. Zlotnik, A. and O. Yoshie, Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity*, 2000. **12**(2): p. 121-7.
126. Prinz, M. and J. Priller, Tickets to the brain: role of CCR2 and CX3CR1 in myeloid cell entry in the CNS. *J Neuroimmunol*, 2010. **224**(1-2): p. 80-4.
127. Stolla, M., et al., Fractalkine is expressed in early and advanced atherosclerotic lesions and supports monocyte recruitment via CX3CR1. *PLoS One*, 2012. **7**(8): p. e43572.
128. Mass, E., et al., Specification of tissue-resident macrophages during organogenesis. *Science*, 2016. **353**(6304).
129. Yarden, Y., et al., Human proto-oncogene c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand. *Embo j*, 1987. **6**(11): p. 3341-51.
130. Zsebo, K.M., et al., Stem cell factor is encoded at the Sl locus of the mouse and is the ligand for the c-kit tyrosine kinase receptor. *Cell*, 1990. **63**(1): p. 213-24.
131. Kitayama, H., et al., Constitutively activating mutations of c-kit receptor tyrosine kinase confer factor-independent growth and tumorigenicity of factor-dependent hematopoietic cell lines. *Blood*, 1995. **85**(3): p. 790-8.
132. Wiktor-Jedrzejczak, W., et al., Total absence of colony-stimulating factor 1 in the macrophage-deficient osteopetrotic (op/op) mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990. **87**(12): p. 4828-32.
133. Marks, S.C., Jr. and P.W. Lane, Osteopetrosis, a new recessive skeletal mutation on chromosome 12 of the mouse. *J Hered*, 1976. **67**(1): p. 11-18.
134. Lichanska, A.M., et al., Differentiation of the mononuclear phagocyte system during mouse embryogenesis: the role of transcription factor PU.1. *Blood*, 1999. **94**(1): p. 127-38.
135. The Jackson Laboratory. Mouse strain datasheet - 000664 C57BL/6J 20.12.2016]; Available from: <https://www.jax.org/strain/000664>.
136. Jung, S., et al., Analysis of fractalkine receptor CX(3)CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion. *Mol Cell Biol*, 2000. **20**(11): p. 4106-14.
137. Muzumdar, M.D., et al., A global double-fluorescent Cre reporter mouse. *Genesis*, 2007. **45**(9): p. 593-605.

138. Deng, L., et al., A Novel Mouse Model of Inflammatory Bowel Disease Links Mammalian Target of Rapamycin-Dependent Hyperproliferation of Colonic Epithelium to Inflammation-Associated Tumorigenesis. *Am J Pathol*, 2010. **176**(2): p. 952-67.
139. Feil, R., et al., Regulation of Cre recombinase activity by mutated estrogen receptor ligand-binding domains. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997. **237**(3): p. 752-7.
140. Danielian, P.S., et al., Modification of gene activity in mouse embryos in utero by a tamoxifen-inducible form of Cre recombinase. *Curr Biol*, 1998. **8**(24): p. 1323-6.
141. Brocard, J., et al., Spatio-temporally controlled site-specific somatic mutagenesis in the mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1997. **94**(26): p. 14559-14563.
142. Qian, B.Z., et al., CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. *Nature*, 2011. **475**(7355): p. 222-5.
143. Srinivas, S., et al., Cre reporter strains produced by targeted insertion of EYFP and ECFP into the ROSA26 locus. *BMC Dev Biol*, 2001. **1**: p. 4.
144. Weiss, J., et al., Versuchstierkunde. Vol. 4. 2014, Stuttgart: Enke Verlag. 533.
145. Hedrich, H., The Laboratory Mouse. 1 ed, ed. G. Bullock and P. Petrusz. 2004, Italy: Elsevier. 600.
146. Graw, J., Entwicklungsgenetik bei Säugern, in Genetik. 2015, Springer Spektrum: Heidelberg, Germany. p. 828.
147. Kaufman, M.H., The Atlas of Mouse Development. Vol. 6. 2005, San Diego, California: Elsevier Academic Press.
148. Erhardt, W., et al., Anästhesie und Analgesie beim Klein- und Heimtier mit Exoten, Labortieren, Vögeln, Reptilien, Amphibien und Fischen. Vol. 2. 2012, Stuttgart: Schattauer. 980.
149. Mulisch, M. and U. Welsch, Romeis Mikroskopische Technik. Vol. 18. 2010, Berlin Heidelberg: Springer Spektrum. 551.
150. Perdiguero, E.G., et al., The Origin of Tissue-Resident Macrophages: When an Erythro-myeloid Progenitor Is an Erythro-myeloid Progenitor. *Immunity*, 2015. **43**(6): p. 1023-4.
151. Gordon, S., A. Pluddemann, and F. Martinez Estrada, Macrophage heterogeneity in tissues: phenotypic diversity and functions. *Immunol Rev*, 2014. **262**(1): p. 36-55.
152. Sheng, J., C. Ruedl, and K. Karjalainen, Most Tissue-Resident Macrophages Except Microglia Are Derived from Fetal Hematopoietic Stem Cells.

- Immunity, 2015. **43**(2): p. 382-93.
153. Chan, W.Y., S. Kohsaka, and P. Rezaie, The origin and cell lineage of microglia: new concepts. *Brain Res Rev*, 2007. **53**(2): p. 344-54.
154. Herbomel, P., B. Thisse, and C. Thisse, Zebrafish early macrophages colonize cephalic mesenchyme and developing brain, retina, and epidermis through a M-CSF receptor-dependent invasive process. *Dev Biol*, 2001. **238**(2): p. 274-88.
155. Cuadros, M.A., et al., First appearance, distribution, and origin of macrophages in the early development of the avian central nervous system. *J Comp Neurol*, 1993. **330**(1): p. 113-29.
156. Mu, J. and S.L. Adamson, Developmental changes in hemodynamics of uterine artery, utero- and umbilicoplacental, and vitelline circulations in mouse throughout gestation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006. **291**(3): p. H1421-8.
157. Haar, J.L. and G.A. Ackerman, Ultrastructural changes in mouse yolk sac associated with the initiation of vitelline circulation. *Anat Rec*, 1971. **170**(4): p. 437-55.
158. McGrath, K.E., et al., Circulation is established in a stepwise pattern in the mammalian embryo. *Blood*, 2003. **101**(5): p. 1669-76.

XIII. DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Christian Schulz bedanken, unter dessen Leitung ich die Möglichkeit hatte dieses interessante Thema zu bearbeiten als auch für seine kompetente wissenschaftliche Betreuung.

Herrn Priv.-Doz. Dr. Sven Reese danke ich für die Übernahme, Durchsicht und Einreichung der vorliegenden Dissertation und vor allem für seine Einsatzbereitschaft selbst im Urlaub.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei meinem Betreuer Herrn Dr. med. Christopher Stremmel für die hervorragende Betreuung, die Einarbeitung in das Projekt und seine unermüdliche Hilfsbereitschaft zur Klärung von Fragen. Durch sein Engagement und seine konstruktiven Ideen vermittelte er viel Freude am wissenschaftlichen Arbeiten.

Ganz herzlicher Dank gilt außerdem der gesamten AG Massberg in der jeder auf seine Art und Weise diese Arbeit unterstützt hat. Hier möchte ich ganz besonders Dr. med. vet. Susanne Sauer, Dr. med. vet. Meike Miller und Gerhild Rosenberger für die nette Integration in die Gruppe, allgegenwärtige Hilfsbereitschaft und für ihren Humor im Arbeitsalltag danken. Anna Titowa und Zeljka Sisic danke ich für ihre Hilfe bei der Anwendung des Durchflusszytometers und Zeljka Sisic nochmals ganz besonders für die zuverlässige und verantwortungsbewusste Betreuung der Tiere im Tierstall. Bei Michael Lorenz bedanke ich mich für sein herausragendes wissenschaftliches Know-how mit dem er jederzeit bei labortechnischen Problemen eine Lösung parat hatte.

Dem SFB914 danke ich für den wissenschaftlichen Austausch, die herausragenden Möglichkeiten der wissenschaftlichen Weiterbildung im Rahmen der Retreats und Seminare. Innerhalb des SFB möchte ich hervorhebend Frau Dr. Verena Kochan erwähnen, die bei Fragen jederzeit zur Verfügung stand.

Zuletzt gilt mein Dank meiner gesamten Familie, besonders meinen Eltern, die mir das Studium ermöglichten und meinem Bruder für seine stete Hilfsbereitschaft und Motivation. Meinem Partner Max Freund danke ich für seine Unterstützung, bemerkenswerte Geduld und motivierenden Worte während der Anfertigung dieser Arbeit.